

André O'Reilly Beringhs

**ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS PARA INCORPORAÇÃO DE
MICROESFERAS CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
Cecropia glaziovii Snethl. OBTIDO POR TURBOEXTRAÇÃO EM
SISTEMAS CARREADORES MULTIPARTICULADOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Diva Sonaglio
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Angela
Machado de Campos

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Beringhs, André O'Reilly

Estratégias tecnológicas para incorporação de
microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia
glaziovii* Snethl. obtido por turboextração em sistemas
carreadores multiparticulados / André O'Reilly Beringhs ;
orientadora, Diva Sonaglio ; coorientadora, Angela Machado
De Campos. - Florianópolis, SC, 2015.
200 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Cecropia glaziovii* Snethl.. 3.
Turboextração. 4. Microesferas. 5. Pellets. I. Sonaglio,
Diva. II. De Campos, Angela Machado. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. IV. Título.

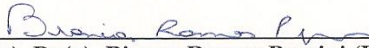
**“ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS PARA
INCORPORAÇÃO DE MICROESFERAS
CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
Cecropia glaziovii Snethl. OBTIDO POR
TURBOEXTRAÇÃO EM SISTEMAS
CARREADORES MULTIPARTICULADOS”**

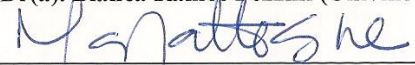
POR

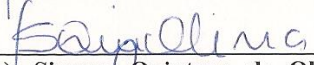
André O'Reilly Beringhs

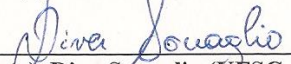
Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

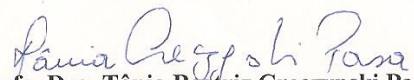
Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Bianca Ramos Pezzini (Univille – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Marcos Antônio Segatto Silva (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Simone Quintana de Oliveira (UFSC - Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Diva Sonaglio (UFSC – Orientador(a))


Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 06 de março de 2015.

Dedico este trabalho à Diva Sonaglio,
minha mentora, pela confiança e amizade.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia (PGFar) da UFSC, bem como aos seus docentes, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento das minhas atividades acadêmicas.

Às minhas queridas orientadoras, Diva e Angela, por aceitarem fazer parte da minha jornada acadêmica. Muito obrigado pelos conhecimentos transmitidos e por acreditarem no meu trabalho.

Aos meus pais, Walter e Tânia, e irmãos, Priscila e Bruno, pelo apoio incondicional e confiança. Agradeço por serem minha inspiração para seguir em frente. Não existem palavras para descrever o quanto sou grato. Amo vocês.

À minha avó Nilza, à madrinha Neusa e ao padrinho Nuno (em memória), pelo amor e apoio em todas as etapas da minha vida. Tenho certeza que, sem a ajuda de vocês, a realização deste sonho não seria possível. Muito obrigado!

Aos meus avós Walter (em memória) e Maria Léa, pelo carinho, amor e atenção que sempre tiveram comigo. Muito obrigado por terem feito parte desta caminhada!

À tia Telma, ao tio Edinho e ao Felipe, por todo o apoio e carinho ao longo dos anos.

Ao Marco, meus sinceros agradecimentos pela paciência e companheirismo nesses anos. Obrigado por tornar essa jornada muito mais fácil!

Às minhas companheiras e amigas de laboratórios, Talitha, Mariana B., Larissa, Priscila, Bárbara e Georgia, e aos ICs, Graziela, Aline e Jonas. O auxílio e amizade de vocês foram primordiais ao meu trabalho. Desejo que nossos caminhos se cruzem muitas e muitas vezes.

Aos meus queridos amigos e colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, Milene, Sandra, Laís, Letícia, Janaína, Thaísa, Gecioni, Simone, Nicoli, Bárbara, Charlise, Rosane, Mariana, Caroline, Gabriela, Viviane e Elenara. Muito obrigado pelos diversos cafezinhos, companheirismo e papos científicos!

Aos professores do Laboratório de Controle de Qualidade, Simone, Marcos e Hellen, e à Profª Tania Pasa, do GEIMM, pelo apoio, conselhos e por permitirem o uso da infraestrutura de pesquisa.

Aos demais familiares, amigos, mestres e colegas, meus sinceros agradecimentos!

“Um sonho não se torna realidade através da magia; leva suor, determinação e trabalho duro”.
(Colin Powell)

RESUMO

O uso de sistemas micro e nanoestruturados têm aumentado significativamente na indústria e pesquisa farmacêutica em decorrência de vantagens como controle de liberação e vetorização do insumo farmacêutico. Entretanto, esses sistemas submicrométricos apresentam dificuldades de processamento, especialmente no que tange às propriedades mecânicas deficientes no estado sólido. Assim, microesferas foram associadas a sistemas peletizados inertes, como forma de melhorar, sobretudo, suas propriedades de fluxo. Como modelo ativo, explorou-se o desenvolvimento de um extrato de *Cecropia glaziovii* Snethl., pela técnica de extração por força de cisalhamento, e sua subsequente incorporação em microesferas poliméricas. A otimização quimiométrica do processo levou à padronização das condições extrativas em 7,5 g de matéria-prima vegetal/100 mL de etanol 80 °GL (6500 rpm/10 min). O extrato bruto apresentou resíduo seco de $0,82 \pm 0,02$ % (m/m). Após secagem, o extrato foi caracterizado em relação aos teores de fenólicos totais ($33,22 \pm 0,83$ %; m/m) e ácido clorogênico ($1,68 \pm 0,03$ %; m/m). As avaliações comportamentais em camundongos indicaram atividade tipo-antidepressiva em doses de 0,1 a 50 mg/kg (v.o.). A preparação das microesferas foi realizada pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente, obtendo-se esferas de diâmetro médio de $4,59 \pm 0,04$ µm, com teor de extrato de $6,5 \pm 0,1$ % (m/m). A associação das microesferas aos *pellets* foi realizada pela técnica de revestimento pelicular em leito fluidizado e as condições ótimas foram alcançadas fazendo uso do copolímero de álcool polivinílico e polietileno glicol com álcool polivinílico a 1 % (m/m), contendo 5 mg/mL de microesferas, na proporção 2:1 de suspensão de revestimento por g de *pellets*. O teor final de microesferas na formulação foi de $28,07 \pm 1,01$ mg por g de *pellets* (rendimento de incorporação de $95,6 \pm 3,4$ %). A associação das microesferas aos *pellets* promoveu melhora na escoabilidade do produto, indicado pela redução nos índices de Carr, Hausner e ângulo de repouso. As microesferas se desassociaram da superfície dos *pellets* rapidamente, sem agregação, ao serem submetidas à tensão hidrodinâmica. Os perfis de liberação indicaram efeito de *burst release* mais pronunciado nos *pellets* revestidos, indicando uma liberação do extrato na suspensão de revestimento durante o processamento da formulação. O sistema desenvolvido poderá ser aplicado na incorporação de outros tipos de micro e nanopartículas, tendo como foco a melhora das propriedades mecânicas do produto.

Palavras-chave: *Cecropia glaziovii* Snethl.; Turboextração; Microesferas; *Pellets*; Leito fluidizado.

ABSTRACT

Title: Technological strategies applied to the association of *Cecropia glaziovii* microspheres to multiparticulate carriers.

Micro and nanoparticles have been increasingly studied due to their advantages regarding drug release control and vectorization. However, these particles have impaired mechanical properties in the solid state. Thus, microspheres were associated to inertial pellets targeting at the improvement of their mechanical properties. A standardized *C. glaziovii* extract was prepared by the shear extraction method and subsequently incorporated into polymeric microspheres. The chemometric optimization of the extraction procedure was performed and the standardized extraction conditions were set as 7.5 g of ground leaves per 100 mL of ethanol 80 °GL (6500 rpm/10 min). The liquid extract (dry residue of 0.82 ± 0.02 %; w/w) was freeze dried and characterized according to its total phenolics (33.22 ± 0.83 %; w/w) and chlorogenic acid content (1.68 ± 0.03 %; w/w). *In vivo* behavioral experiments in Swiss mice indicated antidepressant-like activity when the extract was administered orally (0.1 – 50 mg/kg; p.o.). Extract containing microspheres were prepared using the double emulsion solvent evaporation/extraction technique. The microspheres had a mean diameter of 4.59 ± 0.04 µm and a drug load of 6.5 ± 0.1 % (w/w). The association between microspheres and inertial pellets was performed by film-coating in a top-spray fluidized bed. Optimal coating conditions were achieved using the polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer at a 1 % (w/w) concentration (proportion of 2:1 of coating suspension per g of pellets) containing 5 mg/mL of microspheres. The formulation loading was 28.07 ± 1.01 mg of microspheres per g of pellets (yield of 95.6 ± 3.4 %). The association between microspheres and pellets led to an improvement on the flowability of the final product, as shown by the reduction of the Carr and Hausner indexes and the repose angle. The microspheres were released rapidly from the pellets surface, without significant agglomeration, when exposed to hydrodynamic forces. The release profiles showed a more pronounced burst release effect on the coated pellets, indicating that the microspheres released part of its content in the coating suspension during the coating procedure. The multiparticulate system developed in this study is suitable for further applications using different types of nano and microparticles when an improvement on the mechanical properties of the product is desired.

Keywords: *Cecropia glaziovii* Snethl.; Shear extraction; Microspheres; Pellets; Fluidized bed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização do sistema final obtido por meio da deposição de micropartículas na superfície de <i>pellets</i> com auxílio de polímeros adesivos	33
Figura 2 – Representação esquemática comparativa entre microesferas e microcápsulas	40
Figura 3 – Estrutura química do PLGA e seus produtos de degradação	41
Figura 4 – Esquema de preparação de micropartículas pela técnica de emulsão simples/dupla seguida de evaporação de solvente	42
Figura 5 – Mecanismos de esferonização de acordo com os modelos de Rowe, Baert e Liew	45
Figura 6 – Forças de Van der Waals em função do diâmetro da partícula	47
Figura 7 – Estruturas químicas dos ácidos clorogênico, cafeico e quínico.....	55
Figura 8 – Representação das formas gráficas de apresentação para a metodologia de superfície de resposta.....	59
Figura 9 – Representação do processo de preparação de extratos vegetais por extração por força de cisalhamento.....	66
Figura 10 – Gradiente empregado no método em CLAE.....	68
Figura 11 – Diagrama do processo de preparação do extrato padronizado de <i>C. glaziovii</i> a partir da aplicação de métodos quimiométricos para otimização	72
Figura 12 – Representação esquemática do teste do nado forçado	81
Figura 13 – Representação esquemática do teste do campo aberto.....	81
Figura 14 – Cromatograma típico obtido para extratos de folhas de <i>C. glaziovii</i>	83
Figura 15 – Espectros obtidos pelo detector de arranjo de diodos para os picos dos ácidos clorogênico e cafeico	84
Figura 16 – Curvas analíticas obtidas para os marcadores ACG e ACF, bem como suas respectivas equações e coeficientes de correlação.....	85
Figura 17 – Gráfico de contorno correlacionando o rendimento líquido, em mL, com a quantidade de matéria-prima vegetal e teor etanólico no líquido extrativo	89
Figura 18 – Gráfico de contorno correlacionando a variação de temperatura com a rotação e tempo de extração	91
Figura 19 – Gráfico de contorno correlacionando o resíduo seco com a massa de matéria-prima vegetal e teor etanólico do líquido extrator	93

Figura 20 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de fenólicos totais no extrato bruto e resíduo seco com a massa de matéria-prima vegetal e teor etanólico do líquido extrator.....	97
Figura 21 – Gráfico de contorno correlacionando a eficiência extrativa de fenólicos totais com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal.....	99
Figura 22 – Gráfico de contorno correlacionando a eficiência extrativa de fenólicos totais com o tempo de extração e rotação	100
Figura 23 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico no extrato bruto com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal.....	103
Figura 24 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico no resíduo seco com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal.....	104
Figura 25 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico no resíduo seco com o tempo de extração e rotação	105
Figura 26 – Gráfico de contorno correlacionando a eficiência extrativa de ácido clorogênico com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal.....	107
Figura 27 – Gráficos de consumo energético em tempo real.....	109
Figura 28 – Gráfico de contorno correlacionando o gasto energético total com o tempo de extração e rotação	112
Figura 29 – Gráfico de contorno correlacionando o pico de consumo máximo com a massa de matéria-prima vegetal e rotação	113
Figura 30 - Sobreposição e extrapolação de domínios experimentais entre os planejamentos fatorial e de superfície de resposta.....	115
Figura 31 – Gráfico de contorno correlacionando o resíduo seco com o teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR)	117
Figura 32 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de fenólicos totais com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR)	119
Figura 33 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de fenólicos totais em resíduo seco com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR)	121
Figura 34 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR)	123
Figura 35 – Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico em resíduo seco com teor etanólico e matéria-prima vegetal	124
Figura 36 – Gráfico de desejabilidade para a otimização do processo extrativo de folhas de <i>C. glaziovii</i>	125
Figura 37 – Turboextrato seco otimizado de <i>C. glaziovii</i>	126

Figura 38 – Resultados obtidos para o teste do nado forçado após administração aguda do TESO	128
Figura 39 – Resultados obtidos para o teste do campo aberto após administração aguda do TESO	129
Figura 40 – Resultados obtidos para o teste do nado forçado após administração subcrônica (6 dias) do TESO	130
Figura 41 – Resultados obtidos para o teste do campo aberto após administração subcrônica (6 dias) do TESO	131
Figura 42 – Esquema de preparação dos <i>pellets</i> revestidos com microesferas poliméricas por meio da técnica de leito fluidizado.....	136
Figura 43 – Aparato para determinação do ângulo de repouso estático (θ)	148
Figura 44 – Perfil granulométrico obtido para as microesferas de <i>C. glaziovii</i>	153
Figura 45 – Histogramas de cor RGB para <i>pellets</i> inertes sem revestimento e formulação 15	159
Figura 46 – Gráficos de barra correlacionando a superfície total revestida com a concentração de polímero e proporção entre suspensão de revestimento e massa de <i>pellets</i>	161
Figura 47 – <i>Pellets</i> revestidos com microesferas	161
Figura 48 – Microfotografia das microesferas em suspensão com partículas de celulose microcristalina 101 e <i>pellets</i> inertes triturados.	163
Figura 49 – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para o TESO e microesferas contendo TESO	165
Figura 50 – Micrografias obtidas em microscopia de luz em campo claro e microscopia de epifluorescência para o TESO e o filme de revestimento	166
Figura 51 – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para a fração útil dos <i>pellets</i> inertes (não revestida)	167
Figura 52 – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para os <i>pellets</i> associados às microesferas por revestimento em leito fluidizado	168
Figura 53 – Micrografia eletrônica de varredura obtida para <i>pellets</i> associados às microesferas após secção transversal.....	169
Figura 54 – Micrografias obtidas em microscopia de luz em campo claro e de epifluorescência para os <i>pellets</i> associados às microesferas após secção transversal.....	170
Figura 55 – Cones de repouso formados pelo TESO, microesferas, <i>pellets</i> inertes e <i>pellets</i> revestidos	173
Figura 56 – Curvas de tensão-deformação para os filmes poliméricos de revestimento de PVA-PEG-PVA com e sem microesferas	175

Figura 57 – Curva de desassociação das microesferas da superfície dos <i>pellets</i> em tampão fosfato pH 6,8.....	176
Figura 58 – Representação esquemática do comportamento dos <i>pellets</i> revestidos com microesferas ao entrar em contato com o meio líquido	176
Figura 59 – Curva de desagregação das microesferas após serem liberadas da superfície dos <i>pellets</i>	177
Figura 60 – Perfis obtidos no ensaio de liberação do TESO das microesferas, associadas ou não aos <i>pellets</i>	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Domínio experimental avaliado no planejamento fatorial 2^{4-1} para triagem de fatores relacionados à extração por força de cisalhamento.....	73
Tabela 2 – Domínio experimental avaliado na Metodologia de Superfície de Resposta para otimização de fatores relacionados à extração por força de cisalhamento.....	74
Tabela 3 – Relação de objetivos e importâncias na otimização do processo extrativo.....	78
Tabela 4 – Análise da precisão do método cromatográfico, determinada pela repetibilidade e precisão intermediária.....	86
Tabela 5 – Análise da exatidão do método cromatográfico	87
Tabela 6 – Respostas obtidas para rendimento extrativo no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	89
Tabela 7 – Respostas obtidas para a variação de temperatura no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	90
Tabela 8 – Respostas obtidas para o resíduo seco no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	92
Tabela 9 – Respostas obtidas para o teor de fenólicos totais no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	96
Tabela 10 – Respostas obtidas para a eficiência extrativa de compostos fenólicos no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	98
Tabela 11 – Respostas obtidas para o teor de ácido clorogênico no extrato bruto e resíduo seco no planejamento fatorial fracionado.....	101
Tabela 12 – Respostas obtidas para a eficiência extrativa do ácido clorogênico no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	106
Tabela 13 – Respostas obtidas para os índices de consumo energético no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	111
Tabela 14 – Respostas obtidas para a variação de temperatura e resíduo seco no planejamento MSR IV- <i>Optimal</i>	116
Tabela 15 – Respostas obtidas para o teor de fenólicos totais no planejamento MSR IV- <i>Optimal</i>	118
Tabela 16 – Respostas obtidas para o teor de ácido clorogênico no planejamento MSR IV- <i>Optimal</i>	122
Tabela 17 – Respostas preditas e experimentais para as condições extrativas otimizadas	126
Tabela 18 – Domínio experimental do planejamento fatorial para avaliação de fatores relacionados à associação de microesferas a <i>pellets</i> inertes.....	142

Tabela 19 – Valores de referência para os índices de Hausner e Carr e ângulo de repouso em função do fluxo	147
Tabela 20 – Respostas obtidas para a superfície revestida no planejamento fatorial IV- <i>Optimal</i>	157
Tabela 21 – Respostas obtidas para as avaliações dos parâmetros mecânicos dos produtos obtidos	171

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Forças de Van der Waals em função do tamanho da partícula e distância interparticular	46
Equação 2 – Equação base para os modelos matemáticos delineados por meio dos planejamentos fatoriais	58
Equação 3 – Equação base para os modelos matemáticos delineados por meio dos planejamentos de Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	60
Equação 4 – Índice de desejabilidade global.....	62
Equação 5 – Limite de quantificação	69
Equação 6 – Limite de detecção.....	69
Equação 7 – Rendimento do processo extrativo	75
Equação 8 – Teor de fenólicos totais no resíduo seco.....	76
Equação 9 – Teor de ácido clorogênico no resíduo seco.....	77
Equação 10 – Eficiência extrativa dos marcadores químicos	77
Equação 11 – Modelo matemático para rendimento extrativo	88
Equação 12 – Modelo matemático para variação de temperatura durante processamento	91
Equação 13 – Modelo matemático para resíduo seco	93
Equação 14 – Modelo matemático para fenólicos totais no extrato bruto	95
Equação 15 – Modelo matemático para fenólicos totais no resíduo seco	95
Equação 16 – Modelo matemático para eficiência extrativa de compostos fenólicos	99
Equação 17 – Modelo matemático para ácido clorogênico no extrato bruto	102
Equação 18 – Modelo matemático para ácido clorogênico no resíduo seco.....	103
Equação 19 – Modelo matemático para eficiência extrativa de ácido clorogênico.....	105
Equação 20 – Modelo matemático para consumo energético total ...	110
Equação 21 – Modelo matemático para pico de consumo energético máximo.....	112
Equação 22 – Modelo matemático para resíduo seco (MSR)	117
Equação 23 – Modelo matemático para fenólicos totais no extrato bruto (MSR).....	119
Equação 24 – Modelo matemático para fenólicos totais no resíduo seco (MSR)	120

Equação 25 – Modelo matemático para ácido clorogênico no extrato bruto (MSR)	122
Equação 26 – Modelo matemático para ácido clorogênico no resíduo seco (MSR)	123
Equação 27 – Diâmetro por volume equivalente pela técnica de espalhamento de luz laser	138
Equação 28 – Índice de polidispersão (span) pela técnica de espalhamento de luz laser	138
Equação 29 – Área de superfície específica pela técnica de espalhamento de luz laser	139
Equação 30 – Teor de TESO nas microesferas	139
Equação 31 – Eficiência de encapsulação (EE%) do TESO nas microesferas	140
Equação 32 – Índice de Carr	147
Equação 33 – Índice de Hausner	147
Equação 34 – Ângulo de repouso (θ)	148
Equação 35 – Modelo matemático para porcentagem de superfície revestida	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ACF	Ácido cafeico
ACG	Acido clorogênico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DAD	Detector espectroscópico de arranjo de diodos
DOE	<i>Design of Experiments</i>
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
f₂	Fator de similaridade
FCR	Força Centrífuga Relativa (Força g)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	Gay Lussac
IC	Índice de Carr
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IH	Índice de Hausner
LAMEB	Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PgFar	Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico
PVA-PEG-	Copolímero de álcool polivinílico e polietileno glicol com
PVA	álcool polivinílico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PVP-PVAc	Copolímero de polivinilpirrolidona e vinilacetato
RGB	Sistema de cores vermelho (<i>Red</i>), verde (<i>Green</i>) e azul

(Blue)

RS	Resíduo seco
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TCA	Teste do campo aberto
TESO	Turboextrato Seco Otimizado obtido por extração por força de cisalhamento de folhas de <i>Cecropia glaziovii</i>
TNF	Teste do nado forçado
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Detector espectroscópico na região ultravioleta-visível
v.o.	Via oral
θ	Ângulo de repouso estático
ρ_a	Densidade aparente
ρ_c	Densidade de compactação
ρ_r	Densidade real/absoluta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	31
1.1 OBJETIVOS	36
1.1.1 Objetivo Geral.....	36
1.1.2 Objetivos Específicos	36
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	39
2.1 TECNOLOGIA DE PARTICULADOS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	39
2.1.1 Sistemas microestruturados.....	40
2.1.2 Sistemas multiparticulados	43
2.1.3 Propriedades mecânicas de produtos particulados	46
2.1.4 Associação entre micro e macro estruturas para melhoria do produto	49
2.2 <i>Cecropia glaziovii</i> Snethl. COMO ESPÉCIE VEGETAL DE INTERESSE FARMACÊUTICO.....	51
2.2.1 Farmacologia.....	52
2.2.2 Ácido clorogênico e ácido cafeico	54
2.3 APLICAÇÃO DE DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS COMO FERRAMENTA QUIMIOMÉTRICA.....	56
2.3.1 Planejamentos fatoriais	57
2.3.2 Metodologia de Superfície de Resposta	59
2.3.3 Algoritmos tipo <i>Optimal</i>	60
2.3.4 Algoritmos de otimização	61
3 ESTUDO TECNOLÓGICO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR FORÇA DE CISALHAMENTO DE FOLHAS DE <i>Cecropia glaziovii</i> Snethl.	65
3.1 INTRODUÇÃO.....	65
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
3.2.1 Materiais.....	66
3.2.2 Processamento de matéria-prima vegetal	67
3.2.3 Equipamento cromatográfico	67
3.2.4 Desenvolvimento da metodologia analítica	68
3.2.5 Validação da metodologia analítica.....	68
3.2.5.1 Linearidade	69
3.2.5.2 Limites de Detecção e Quantificação.....	69
3.2.5.3 Precisão.....	70
3.2.5.4 Exatidão.....	70
3.2.5.5 Especificidade.....	70
3.2.6 Extração por força de cisalhamento	70
3.2.7 Delineamento experimental.....	71
3.2.7.1 Planejamento fatorial 2^{4-1} para triagem	72
3.2.7.2 Metodologia de Superfície de Resposta para otimização	74
3.2.8 Análise de variáveis dependentes.....	75

3.2.8.1	Rendimento.....	75
3.2.8.2	Variação de temperatura de processamento.....	75
3.2.8.3	Resíduo seco.....	75
3.2.8.4	Teor de fenólicos totais nas soluções extrativas	75
3.2.8.5	Teor de fenólicos totais nos resíduos secos	76
3.2.8.6	Teor de ácido clorogênico nas soluções extrativas	77
3.2.8.7	Teor de ácido clorogênico nos resíduos secos	77
3.2.8.8	Eficiência extrativa.....	77
3.2.8.9	Consumo energético	78
3.2.9	Otimização quimiométrica.....	78
3.2.10	Secagem do extrato otimizado	78
3.2.11	Avaliação da atividade tipo-antidepressiva	79
3.2.11.1	Animais.....	79
3.2.11.2	Tratamento.....	80
3.2.11.3	Teste do nado forçado.....	80
3.2.11.4	Teste do campo aberto.....	81
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
3.3.1	Desenvolvimento da metodologia analítica.....	82
3.3.2	Validação da metodologia analítica.....	84
3.3.2.1	Linearidade	84
3.3.2.2	Limites de Detecção e Quantificação	85
3.3.2.3	Precisão.....	86
3.3.2.4	Exatidão.....	86
3.3.3	Estudo de triagem do processo extrativo	87
3.3.3.1	Rendimento extrativo líquido	88
3.3.3.2	Variação de temperatura	90
3.3.3.3	Resíduo seco.....	92
3.3.3.4	Fenólicos totais	94
3.3.3.5	Eficiência extrativa de fenólicos totais	98
3.3.3.6	Ácido clorogênico.....	101
3.3.3.7	Eficiência extrativa de ácido clorogênico	105
3.3.3.8	Consumo energético	107
3.3.4	Estudo de otimização do processo extrativo	113
3.3.4.1	Variação de temperatura e resíduo seco.....	116
3.3.4.2	Fenólicos totais.....	118
3.3.4.3	Ácido clorogênico.....	121
3.3.4.4	Otimização quimiométrica.....	124
3.3.4.5	Preparação do turboextrato seco otimizado (TESO).....	126
3.3.5	Avaliação da atividade tipo-antidepressiva	127
3.4	CONCLUSÕES	131
4	PREPARAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS DE <i>C. glaziovii</i> Snethl. A SISTEMAS CARREADORES MULTIPARTICULADOS	135
4.1	INTRODUÇÃO.....	135
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	136

4.2.1	Materiais.....	136
4.2.2	Preparação das microesferas de <i>C. glaziovii</i>	137
4.2.2.1	Análise de espalhamento de luz laser.....	138
4.2.2.2	Eficiência de encapsulação e teor de TESO	139
4.2.2.3	Espectroscopia do ultravioleta do TESO	140
4.2.3	Fracionamento dos <i>pellets</i> inertes.....	140
4.2.4	Estudos para associação das microesferas aos <i>pellets</i>	141
4.2.5	Preparação e caracterização dos sistemas multiparticulados revestidos com microesferas de <i>C. glaziovii</i>	143
4.2.5.1	Determinação do teor de microesferas associadas à superfície dos <i>pellets</i>	144
4.2.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	145
4.2.5.3	Microscopia de Epifluorescência	145
4.2.5.4	Determinação da esfericidade dos produtos.....	146
4.2.5.5	Determinação das densidades real, aparente e de compactação	146
4.2.5.6	Determinação dos índices de Hausner e de Carr	147
4.2.5.7	Determinação do ângulo de repouso estático	147
4.2.5.8	Avaliação mecânica dos filmes de revestimento.....	149
4.2.5.9	Avaliação da capacidade de desassociação das microesferas da superfície dos <i>pellets</i>	149
4.2.5.10	Avaliação da capacidade de desagregação das microesferas da superfície dos <i>pellets</i>	150
4.2.5.11	Estudo de liberação do TESO a partir dos sistemas obtidos	150
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
4.3.1	Preparação e caracterização granulométrica das microesferas de <i>C. glaziovii</i>	152
4.3.2	Eficiência de encapsulação e teor de TESO nas microesferas.....	153
4.3.3	Fracionamento dos <i>pellets</i> inertes.....	155
4.3.4	Estudos de associação das microesferas aos <i>pellets</i>	156
4.3.5	Teor de microesferas associadas aos <i>pellets</i>	162
4.3.6	Caracterização micromorfológica dos sistemas obtidos	164
4.3.7	Avaliação das densidades e propriedades de fluxo dos produtos obtidos.....	170
4.3.8	Avaliação mecânica dos filmes de revestimento	174
4.3.9	Avaliação da capacidade de desassociação das microesferas da superfície dos <i>pellets</i>	175
4.3.10	Avaliação da capacidade de desagregação das microesferas da superfície dos <i>pellets</i>	177
4.3.11	Estudo de liberação do TESO.....	178
4.4	CONCLUSÕES	180
4	CONCLUSÃO GERAL	183
	REFERÊNCIAS	187

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para vetorização de fármacos é uma necessidade constante no meio farmacêutico. Em se tratando de administração rotineira, a via oral representa uma estratégia adequada para veiculação de fármacos, evitando o inconveniente da dor e de possíveis consequências indesejáveis após aplicações invasivas, impactando diretamente na adesão do paciente ao tratamento (ANSEL et al., 2007; AULTON; TAYLOR, 2013). No entanto, a administração oral se constitui num grande desafio, uma vez que a biodisponibilidade por esta via é complexa, e existe a necessidade constante de doses para manter adequada concentração plasmática dos princípios ativos. Além disso, as características fisiológicas do trânsito gastrointestinal se apresentam desafiadoras ao desenvolvimento galênico de novos produtos. A velocidade de trânsito intestinal acarreta em uma significativa dificuldade, em especial para a utilização de dispositivos de liberação prolongada (AULTON; TAYLOR, 2013), por tornar a capacidade de liberação destes dependente do seu tempo de permanência no trato gastrointestinal. A possibilidade de modulação da liberação, acarretando na diminuição da necessidade de doses, é uma questão fundamental, sobretudo na terapêutica de patologias crônicas cuja adesão do paciente tende a reduzir ao longo do tratamento (MARLEBI et al., 2000; LINGAM; SCOTT, 2002; ETTINGER; BAKER, 2009; VALENTE et al., 2013; DEL ÁGUILLA et al., 2015). Nestes casos, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para administração por via oral, com perfil de liberação prolongada e adequada permanência no trato gastrointestinal, apresenta-se como uma meta constante de desenvolvimento na área da tecnologia farmacêutica.

Nesse contexto, sistemas terapêuticos baseados em micropartículas, sejam estas microcápsulas ou microesferas, têm sido extensamente estudados no âmbito da administração por via oral (KUMAR et al., 2006; BUILDERS et al., 2008; DOS SANTOS, 2012; SUKSAMRAN et al., 2013). Trata-se de sistemas micrométricos, com tamanhos de partícula na faixa de 1 a 1000 μm , que apresentam forte potencial à modulação da liberação de fármacos (FREITAS et al., 2005). Dessa forma, características específicas desses sistemas podem ser adaptadas, com o intuito de diminuir o efeito que o trânsito intestinal exerce sobre estas (DUCHÊNE; PONCHEL, 1997), facilitando assim a utilização desses como auxiliares na redução da frequência de doses.

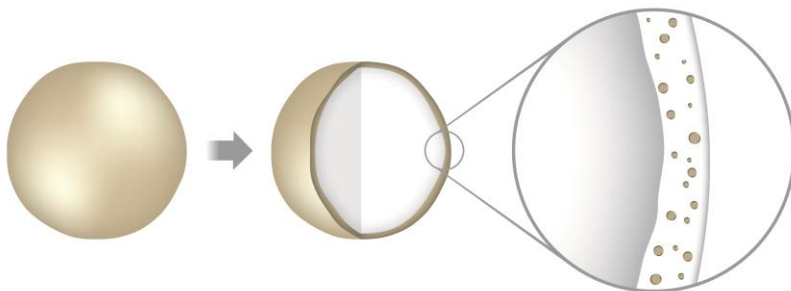
A aplicação de micropartículas com características enterorretentivas tem se tornado uma opção interessante ao desenvolvimento desses sistemas. Partículas com essas características apresentam a capacidade de interagir com membranas biológicas e prolongar o seu tempo de residência no local de interesse (PATHAN et al., 2008) por meio de alterações químico-funcionais, tais como o emprego de materiais catiônicos em sua preparação (MAZZARINO et al., 2012). Além disso, em alguns casos, a simples modificação de características morfológicas já permite uma maior retenção de partículas no trato gastrointestinal, como, por exemplo, por meio da redução no tamanho de partícula. A redução no tamanho de partícula promove o aumento na área de superfície específica do sistema, aumentando sua reatividade com membranas biológicas (AULTON; TAYLOR, 2013). Apesar de todas as vantagens detalhadas, micropartículas ainda apresentam algumas limitações no âmbito tecnológico, limitações estas que dificultam sua implementação em escala industrial. Quando são preparadas em tamanhos menores que 50 μm , uma faixa granulométrica considerada adequada para interação com as mucosas gastrointestinais (GOTO et al., 2006), essas partículas passam a apresentar fluxo bastante reduzido, o que dificulta significativamente a preparação de comprimidos e cápsulas (MERKKU et al., 1994; JONES, 2001; AULTON; TAYLOR, 2013). Além disso, o fluxo reduzido também acarreta em maior dificuldade das partículas em se dispersarem no trato gastrointestinal após desintegração da forma farmacêutica em que estão inseridas (BECHGAARD, 1982).

Uma solução viável para promover o melhoramento das características tecnológicas das micropartículas, sem impactar significativamente em suas características biofarmacêuticas, é a utilização de sistemas multiparticulados como carreadores destas. Os sistemas multiparticulados peletizados (*pellets*), preparados pela tecnologia de extrusão-esferonização, têm sido amplamente empregados na indústria farmacêutica, em decorrência de suas inúmeras vantagens tecnológicas e biofarmacêuticas, quando comparados aos pós e aos grânulos obtidos pela via clássica. Por apresentarem propriedades de fluxo livre, são mais adequados como formas intermediárias, para o preenchimento de cápsulas e preparação de comprimidos, garantindo melhor uniformidade do conteúdo (BASHAIWOLDU et al., 2004). Além disso, quando comparados a sistemas unitários, conferem menor variabilidade na absorção do fármaco e menor risco de irritação do trato gastrointestinal e de “*dose dumping*” (BECHGAARD, 1982; GHEBRE-SELLASSIE, 1994; AGUILAR-DE-LEYVA et al., 2011). *Pellets*

também se apresentam como forma farmacêutica de interesse para estudos de revestimento em decorrência da sua forma esférica e superfície lisa e uniforme, o que promove um revestimento mais homogêneo em comparação aos comprimidos e cápsulas, garantindo maior qualidade e segurança ao produto final (GHEBRE-SELLASSIE, 1989; CHOPRA et al., 2002). Face ao exposto, a associação das micropartículas a *pellets* permite o desenvolvimento de um sistema terapêutico que une aplicabilidade industrial com a possibilidade de modulação do perfil de liberação. Tal sistema se apresenta altamente adequado para implementação na produção de medicamentos de uso contínuo, especialmente devido à diminuição da necessidade de múltiplas doses, podendo ser empregados na terapêutica de doenças crônicas de grande impacto na saúde pública.

Assim, propõe-se o desenvolvimento de um sistema constituído de um núcleo carreador peletizado inerte, revestido com micropartículas embebidas em um filme polimérico altamente hidrossolúvel (Figura 1). O sistema obtido permite o carregamento das micropartículas e o subsequente processamento técnico na forma de cápsulas e comprimidos. Ao serem submetidos aos fluidos gástricos, tais sistemas liberam as micropartículas no trânsito gástrico rapidamente, em decorrência da alta solubilidade do filme polimérico, permitindo assim o início da liberação do insumo farmacêutico ativo incorporado nas micropartículas.

Figura 1. Esquematização do sistema final obtido por meio da deposição de micropartículas na superfície de *pellets* com auxílio de polímeros adesivos.



Em decorrência de suas características biofarmacêuticas, estes sistemas apresentam-se interessantes para o desenvolvimento de medicamentos para tratamento de doenças crônicas. Dentre as doenças consideradas de maior capacidade debilitante, aquelas que influenciam

significativamente a estabilidade comportamental do indivíduo são consideradas as mais importantes em aspectos clínicos e epidemiológicos (MOUSSAVI et al., 2007). Distúrbios da depressão são considerados hoje os maiores causadores da evasão laboral, representando um forte impacto econômico na sociedade, e correspondem a uma razoável parcela das condições tratadas nos serviços primários de atenção à saúde (MOUSSAVI et al., 2007; SCHOFIELD et al., 2013). Em decorrência da sua alta prevalência e longo tempo de duração, a depressão se tornou um problema maior de saúde pública, apresentando-se como uma das doenças crônicas de maior foco na última década. Em fato, trata-se de um transtorno psiquiátrico recorrente e potencialmente fatal devido às altas taxas de suicídio (NESTLER et al., 2002; HOLTZHEIMER; NEMEROFF, 2006). Em 2005, estimava-se que 17 % da população mundial era afetada pela depressão, e que um em cada seis indivíduos norte-americanos seria acometido por este transtorno no decorrer de sua vida (KESSLER et al., 2005). Além disso, essa é considerada a quarta maior causa de incapacitação nos países desenvolvidos, e segundo projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), será a segunda principal causa de incapacidade até 2020 (MURRAY; LOPEZ, 1997; RUNCAN et al., 2010). Embora não existam estudos epidemiológicos específicos para a depressão em Santa Catarina, acredita-se que parcelas semelhantes da população são acometidas por esse transtorno no estado, seguindo assim o mesmo padrão de prevalência detectado em outras regiões do país (ANDRADE et al., 2012) e no mundo (KESSLER et al., 2005). Desta forma, a depressão se apresenta como uma doença de grande impacto na saúde pública, requerendo esforços conjuntos na melhora da terapêutica medicamentosa com o intuito de atenuar suas implicações sociais e econômicas.

Na última década, houve um aumento exponencial nas pesquisas relacionadas às plantas psicoativas em decorrência do crescimento relevante na prevalência de transtornos psiquiátricos. O foco voltado às plantas psicoativas se justifica pelo fato destas representarem uma opção terapêutica potencialmente mais barata, segura e com menos efeitos colaterais em comparação aos fármacos antidepressivos comuns (exemplificando: efeitos colinérgicos, disfunção sexual, insônia e síndrome de retirada) (BALDWIN et al., 2007; PAPAKOSTAS, 2008; SCHWEITZER et al., 2009). Neste contexto, a espécie *Cecropia glaziovii* Snethl., popularmente conhecida por embaúba vermelha, presente em praticamente toda a extensão da Mata Atlântica, apresenta-se como uma espécie de interesse para o desenvolvimento de novos

medicamentos para o tratamento da depressão. Estudos demonstraram significativa atividade no sistema nervoso central como agente tipo-antidepressivo (ROCHA et al., 2007) e tipo-ansiolítico (ROCHA et al., 2002), assim como atividades hipotensora (LIMA-LANDMAN et al., 2007), antiasmática (DELARCINA JR. et al., 2007) e hipoglicemiante (ANDRADE-CETTO; VÁZQUEZ, 2010; AREND, 2010). Os estudos em questão indicam que essa se trata de uma espécie promissora para o possível desenvolvimento de medicamentos psicoativos. Detectou-se que ratos tratados com extratos aquosos e frações butanólicas da espécie apresentaram níveis bastante elevados de monoaminas, o que sugere que o seu mecanismo de ação é decorrente da inibição da recaptação destas, justificando assim sua ação antidepressiva (ROCHA et al., 2007). Face ao exposto, a espécie *C. glaziovii* se apresenta como uma espécie biologicamente ativa adequada para sua utilização como modelo no desenvolvimento dos sistemas de liberação modificada.

Nesse contexto, este trabalho visa ao desenvolvimento de um sistema multiparticulado de uso oral que una as características biofarmacêuticas de sistemas microestruturados com as vantagens tecnológicas de *pellets* preparados pela técnica de extrusão-esferonização. O trabalho descreve o processo de preparação desse produto, desde a otimização do processo extrativo a partir de folhas de *C. glaziovii*, passando pela incorporação do extrato seco padronizado em microesferas de liberação prolongada, e terminando na deposição destas em sistemas multiparticulados em leito fluidizado. A importância deste trabalho vai além do demonstrado, e a abordagem farmacotécnica utilizada poderá ser expandida em futuros estudos para outros tipos de sistemas micro e nanoestruturados, contendo diferentes tipos de insumos farmacêuticos ativos, quando houver necessidade da melhora das propriedades mecânicas do produto sólido final.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Propõe-se o desenvolvimento de um produto farmacêutico multiparticulado de uso oral utilizando *pellets* como carreadores de microesferas de liberação prolongada contendo extrato padronizado de *C. glaziovii* com atividade tipo-antidepressiva como modelo ativo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Preparar, caracterizar e otimizar extratos de *C. glaziovii* buscando maximizar o processo extrativo de forma racional.
- 2) Avaliar o potencial tipo-antidepressivo *in vivo* do extrato bruto quimicamente otimizado.
- 3) Desenvolver sistemas microestruturados e caracterizá-los quanto às propriedades químicas e físicas.
- 4) Avaliar a capacidade de incorporação dos sistemas microestruturados em *pellets* inertes por deposição em leito fluidizado.
- 5) Determinar as características tecnológicas dos produtos obtidos.
- 6) Aplicar planejamentos experimentais adequados, no decorrer do trabalho procurando identificar fatores de formulação e de processo que influenciam as respostas pertinentes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECNOLOGIA DE PARTICULADOS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Estima-se que, no início dos anos 2000, cerca de 90 % dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico mundial faziam uso de algum tipo de sistema particulado (HICKEY et al., 2003). Dentre esses produtos, podemos destacar principalmente as cápsulas, comprimidos, suspensões e dispersões, os quais constituem a vasta maioria dos produtos disponíveis no mercado farmacêutico.

Em geral, produtos particulados secos são mais estáveis, de mais fácil manipulação, armazenamento e transporte quando comparados àqueles no estado líquido (AULTON; TAYLOR, 2013). Por essa razão, existe uma tendência mundial ao crescimento desses produtos. Como consequência, novas estratégias vêm surgindo continuamente nas últimas décadas visando agregar valor aos produtos particulados. Dentre elas, grande foco é dado ao desenvolvimento de produtos de liberação modificada (SOOD et al., 2004; GANDHI et al., 2005; YE et al., 2010; AULTON; TAYLOR, 2013; GIRI et al., 2013).

Dentre as vias de administração, a via oral é a mais oportuna por permitir uma terapia indolor e de fácil administração e, portanto, aumentando a adesão do paciente ao tratamento farmacoterapêutico (ANSEL et al., 2007). Entretanto, a via oral se apresenta desafiadora para a administração de produtos de liberação modificada uma vez que a liberação é limitada pelo tempo de trânsito gastrointestinal. Além disso, o próprio microambiente gástrico por si representa um desafio ao farmacotecnista, e os sistemas de liberação modificada precisam ser delineados de tal maneira que resistam às condições adversas desde o início do trânsito gastrointestinal (AULTON; TAYLOR, 2013).

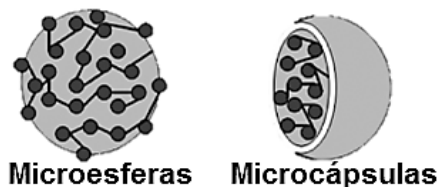
Dentre os produtos de liberação modificada, podemos considerar duas principais categorias: produtos de liberação retardada ou prolongada (BRASIL, 2010; AULTON; TAYLOR, 2013). Os produtos de liberação retardada são aqueles que apresentam um período de tempo entre a administração e o início da dissolução do fármaco, o que inclui os dispositivos gastrorresistentes. Esse tipo de sistema é interessante quando se visa direcionar o fármaco para absorção ou ação em uma determinada região do trato gastrointestinal. Por sua vez, os produtos de liberação prolongada são aqueles que liberam o fármaco de forma sustentada, auxiliando na redução da frequência posológica e, potencialmente, reduzindo efeitos colaterais associados a picos de concentração plasmática de fármacos (BECHGAARD, 1982).

Sendo assim, produtos que apresentam um perfil de liberação prolongada podem definitivamente melhorar a terapêutica, em especial em casos de doenças crônicas ou quando se faz necessária a manutenção da concentração plasmática do fármaco por um maior período de tempo. Por essa razão, diversos sistemas têm sido estudados neste âmbito para a administração por via oral, tais como comprimidos matriciais hidrofílicos, lipofílicos, grânulos matriciais, sistemas revestidos, microesferas, microcápsulas, dentre outras inúmeras formas farmacêuticas, clássicas ou não.

2.1.1 Sistemas microestruturados

Dentre os sistemas microestruturados já desenvolvidos para veiculação oral de fármacos, podemos distinguir basicamente as microesferas (sistemas matriciais) e as microcápsulas (sistemas reservatórios) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática de microesferas e microcápsulas.
Adaptada de Pimentel e colaboradores (2007).

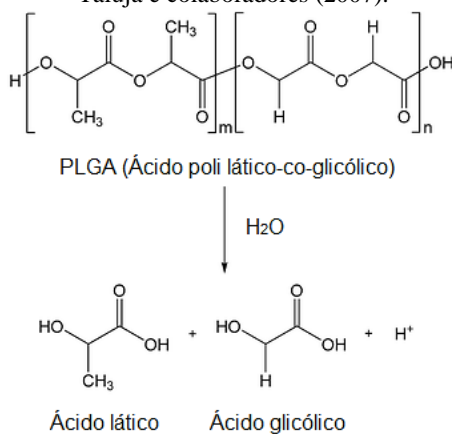


As microcápsulas são sistemas micrométricos, com tamanho de partícula na faixa de 1 a 1000 μm , constituídos por um ou diversos núcleos contendo o fármaco envolto por um invólucro, usualmente lipídico ou polimérico, sólido ou líquido. Já as microesferas também são sistemas micrométricos e apresentam estrutura onde o insumo farmacêutico ativo se encontra em estado de dispersão molecular na matriz, também usualmente lipídica ou polimérica. Este tipo de sistema possui larga aplicação industrial por permitir a incorporação de moléculas hidrofílicas ou lipofílicas (PIMENTEL et al., 2007) e também por sua preparação ser possível utilizando uma vasta gama de materiais. É possível encontrar na literatura diversos relatos de preparação de micropartículas com polímeros, sendo os mais comuns o ácido poli láctico-co-glicólico (DOS SANTOS, 2012; GAIGNAUX et al., 2012), a quitosana (SINGH et al., 2013), a policaprolactona (ALMEIDA et al., 2014) e derivados do ácido metacrílico (DE SOUZA; MARCHETTI,

2012; GAREKANI et al., 2013). Além disso, os estudos com micropartículas lipídicas também têm aumentado significativamente, com grande destaque para lipídeos como o álcool cetílico (PERGE et al., 2012) e o ácido esteárico (HOSSEINI; ESLAMI, 2010).

Em relação às micropartículas poliméricas, o polímero mais largamente empregado, o qual também foi alvo de estudo neste trabalho, é o ácido poli lático-co-glicólico (PLGA), um copolímero dos ácidos lático e glicólico. Esse copolímero hidrofóbico é capaz de formar matrizes e cápsulas de liberação prolongada, cujo perfil de liberação é modulado majoritariamente por suas características físicas, como porosidade e área de superfície, e químicas, como proporção de ácido lático para glicólico na cadeia polimérica (GAIGNAUX et al., 2012). Desta forma, é possível obter perfis de liberação em uma larga faixa cronológica, de horas (JIANG et al., 2014) a meses (GAIGNAUX et al., 2012). Além disso, o PLGA é altamente biocompatível e biodegradável (MAKADIA; SIEGEL, 2011), sofrendo lenta hidrólise de suas ligações éster ao entrar em contato com meios aquosos (Figura 3) (TALUJA et al., 2007). Em geral, quanto mais unidades de ácido lático na cadeia polimérica, mais lentamente ocorrerá a hidrólise deste polímero (TALUJA et al., 2007; MAKADIA; SIEGEL, 2011).

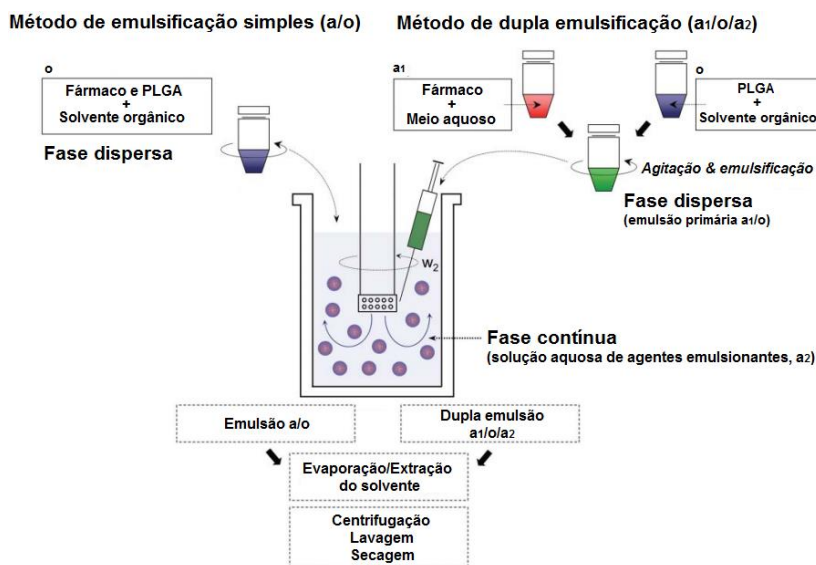
Figura 3. Estrutura química do PLGA e seus produtos de degradação (m e n se referem às unidades de ácido lático e glicólico, respectivamente.). Adaptada de Taluja e colaboradores (2007).



Por se tratar de um copolímero aprovado para uso humano pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão sanitário dos Estados

Unidos, grande foco é dado ao desenvolvimento de produtos contendo esse copolímero, desde dispositivos implantáveis até sistemas para veiculação de fármacos por via oral. Em relação a estes, diversas técnicas avançadas para preparação de micropartículas podem ser usadas, tais como: secagem em torre de aspersão (*spray-drying*) (WAN et al., 2013), separação de fases (coacervação) (HUA et al., 2003) e fluidificação supercrítica (DHANDA et al., 2013). Entretanto, as mais comumente empregadas, em decorrência da facilidade de execução e controle do processo, são as técnicas de emulsão simples/múltipla seguida de evaporação e/ou extração de solvente (JAIN, 2000; GAIGNAUX et al., 2012; JIANG et al., 2014).

Figura 4. Esquema de preparação de micropartículas pela técnica de emulsão simples/dupla seguida de evaporação de solvente. Adaptado de Taluja e colaboradores (2007).



A técnica de emulsão simples consiste na dissolução de um fármaco lipofílico e do PLGA em um solvente orgânico, sendo os mais usualmente empregados o clorofórmio, diclorometano, acetona ou acetato de etila (TALUJA et al., 2007), seguido de sua dispersão em uma fase aquosa contínua contendo um agente emulsionante (Figura 4). Já no caso da técnica de dupla emulsão, o fármaco hidrofílico é dissolvido em meio aquoso e emulsionado com uma solução de PLGA

em solvente orgânico, obtendo assim uma emulsão primária água em óleo (a_1/o). A emulsão a_1/o é então emulsificada em uma fase contínua aquosa contendo agentes emulsionantes, formando uma dupla emulsão água em óleo em água ($a_1/o/a_2$) (Figura 4). Para ambos os casos, o solvente orgânico é removido por evaporação e/ou extração, as partículas são lavadas para remoção do agente emulsionante, e secas, obtendo assim as micropartículas prontas para uso. A técnica de dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente já se mostrou interessante para encapsulação de extratos vegetais de caráter hidrofílico (DOS SANTOS, 2012) e, portanto, foi a técnica de escolha para o desenvolvimento das formulações microestruturadas neste trabalho.

2.1.2 Sistemas multiparticulados

O termo “sistemas multiparticulados”, dentro da área de tecnologia de particulados, pode ser utilizado como designação para qualquer sistema constituído por múltiplas unidades. Tais sistemas, em especial os grânulos e minicomprimidos, já são largamente difundidos na indústria farmacêutica. Em geral, esses sistemas são mais versáteis quando comparados aos sistemas monolíticos tradicionais por conferirem versatilidade no ajuste de dose, facilidade de dispersão no trato gastrointestinal e a possibilidade de combinar diferentes fármacos, com diferentes perfis de liberação, em um único produto final (AULTON; TAYLOR, 2013).

Dentre os sistemas multiparticulados empregados na indústria farmacêutica, os sistemas peletizados produzidos pela técnica de extrusão seguida de esferonização são largamente utilizados em decorrência de suas boas propriedades mecânicas e, também, por permitirem modular a liberação do fármaco de acordo com a necessidade. O processo para preparação desses sistemas é constituído, na realidade, de um conjunto de operações unitárias sucessivas que levam à obtenção de microgrânulos de características bastante refinadas. As operações envolvidas nesse processo consistem de: mistura de pós, molhagem, extrusão, esferonização e secagem. Por fim, obtêm-se os microgrânulos, comumente denominados *pellets* (CHATCHAWALSAISIN et al., 2005).

Por apresentarem um perfil de distribuição granulométrico geralmente estreito, superfície lisa e forma esférica bem definida, os *pellets* apresentam ótimas propriedades de escoamento (MERKKU et al., 1994; BASHAIWOLDU et al., 2004), desta forma facilitando o processamento industrial do produto em sistemas de alimentação por gravidade, como máquinas de comprimir, encapsular e envasar. Além

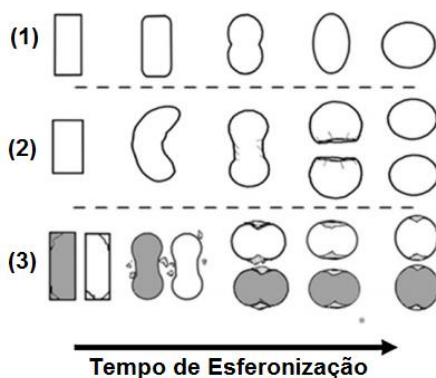
disso, o fluxo livre dos *pellets* é interessante também do ponto de vista biológico. Cada unidade do sistema se dispersa livremente no trato gastrointestinal, evitando efeitos de toxicidade local, como pode ser observado, por exemplo, em comprimidos matriciais, uma vez que a dose total do insumo ativo está distribuída em inúmeras unidades particuladas que se dispersam espontaneamente (BECHGAARD, 1982).

Os *pellets* são núcleos de alta coesão, usualmente densos e pouco friáveis, com baixa resiliência elástica (AULTON et al., 1994). Por essa razão, são excelentes produtos intermediários para preparação de comprimidos, uma vez que facilmente sofrem deformação plástica. Para essa função, o excipiente usualmente empregado na preparação dos *pellets* é a celulose microcristalina, por apresentar excelente comportamento plástico (JOHANSSON; ALDERBORN, 1996). Também é possível verificar exemplos bem sucedidos de comprimidos contendo *pellets* preparados com excipientes intragranulares como lactose e fosfato de cálcio (GÓMEZ-CARRACEDO et al., 2008), β -ciclodextrina (SANTOS et al., 2004), Eudragit RS PO/RL PO (ABBASPOUR et al., 2007) e amido (MEHTA et al., 2012).

Quando comparado a outros processos de produção de grânulos por via úmida, a peletização por extrusão/esferonização apresenta como diferencial uma etapa de compactação da massa em pequenos cilindros (extrusão), seguida da quebra e arredondamento destas estruturas em esferas (esferonização) (KLEINEBUDDE, 1997). Mais recentemente, tem se discutido quais são os verdadeiros mecanismos físicos envolvidos no processo de esferonização destes e o impacto destes mecanismos nas propriedades do produto obtido (KOESTER; THOMMES, 2010). O mecanismo clássico de formação de *pellets*, descrito por Rowe (1985), caracteriza o processo como somente a quebra do extrusado em diversas porções semelhantes, seguido da deformação plástica destes pelo atrito com o equipamento e outras partículas, alcançando assim a forma esférica esperada (Figura 5). Posteriormente, Baert e colaboradores (1993) descrevem um novo mecanismo envolvido no processo de esferonização. Neste caso, quando o produto da quebra inicial do extrusado ainda é muito grande (usualmente com comprimento de duas a três vezes superior ao seu diâmetro), ocorre um afinamento na região central formando uma estrutura em forma de halter, a qual se quebra e esferoniza (Figura 5). Já mais recentemente, um terceiro mecanismo, descrito por Liew e colaboradores (2007), associa o acúmulo de partículas finas na região central do extrusado em forma de halter, auxiliando na formação da estrutura de esfera (Figura 5). Este mecanismo, posteriormente

expandido (KOESTER; THOMMES, 2010), auxiliou na elucidação dos mecanismos de transferência de massa no processo de esferonização, os quais exercem grande influência nas características físicas do produto. Dependendo do teor de umidade utilizado na massa úmida, mais de 50 % da massa final dos *pellets* preparados pode estar envolvida no mecanismo de transferência de massa (KOESTER; THOMMES, 2012). Além disso, a celulose microcristalina, excipiente universalmente utilizado na extrusão/esferonização, tem apresentado os mais altos índices de transferência de massa (KOESTER et al., 2012) quando comparado a outros excipientes.

Figura 5. Mecanismos de esferonização de acordo com os modelos de (1) Rowe, (2) Baert e (3) Liew. Adaptado de Koester e colaboradores (2012).



Como impacto deste mecanismo, assume-se que a transferência de massa influencia diretamente as características morfológicas dos *pellets* obtidos. Conforme destacado anteriormente, a capacidade de escoamento dos *pellets* está diretamente ligada às características de superfície do produto, tais como esfericidade e rugosidade, sendo estas diretamente afetadas pela transferência de massa no processo de esferonização. Além disso, uma das maiores vantagens desses sistemas é a facilidade em produzir formas farmacêuticas homogeneamente revestidas, uma vez que a superfície esférica dos *pellets* facilita o processo de revestimento (KÁLLAI et al., 2010; AULTON; TAYLOR, 2013).

2.1.3 Propriedades mecânicas de produtos particulados

O comportamento mecânico de partículas, seja em dispersões sólidas, líquidas ou gasosas, está diretamente ligado às propriedades físicas da partícula, as quais incluem: tamanho médio, dispersão de tamanho, forma, densidade e higroscopicidade (HICKEY et al., 2003). O comportamento de sistemas multiparticulados é dependente de forças interparticulares, ou seja, forças que uma partícula exerce na outra, e forças exercidas pelo meio onde essas partículas estão dispersas. Dentre as forças interparticulares, destacam-se as forças eletrostáticas, de Van der Waals e capilares, responsáveis por grande parte dos fenômenos associados ao comportamento mecânico de produtos particulados (HICKEY et al., 2003).

Dentre as propriedades físicas da partícula, o tamanho médio é a mais importante e de onde se deduz grande parte do comportamento mecânico, uma vez que as leis de movimento das partículas são governadas majoritariamente pelo tamanho delas. Com base nestas informações, pode-se determinar a área de superfície da partícula, a qual está relacionada à capacidade de adesão e escoamento da mesma. De forma geral, assume-se que partículas menores apresentam maior área de superfície, logo são mais reativas e aderem mais facilmente a superfícies de outras partículas, dessa forma apresentam maior resistência ao escoamento e reduzido fluxo. Além disso, usualmente partículas menores apresentam menor massa particular, acarretando em maior força de adesão (VISSER, 1989).

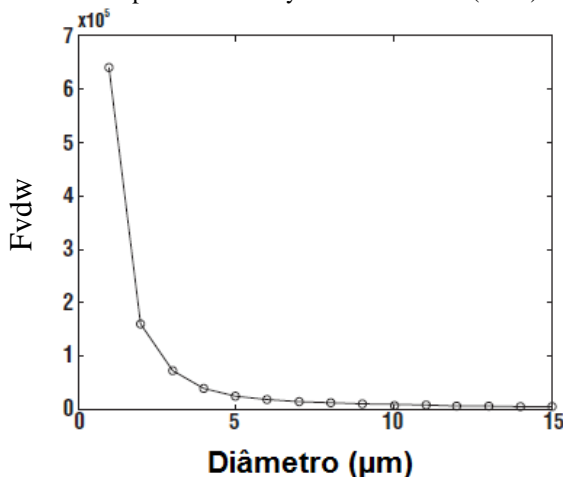
A adesão interparticular é um fenômeno físico associado às forças de atração/coesão e repulsão. Tal fenômeno é usualmente associado às forças eletrostáticas, dependentes da carga de superfície das partículas, e às forças não-elétricas, como interações intermoleculares de Van der Waals e forças capilares. As interações interparticulares por força de Van der Waals (VISSER, 1989), em especial, são diretamente afetadas pelo tamanho de partícula (Equação 1) e apresentam maior impacto na capacidade de escoamento de pós, uma vez que são mais fortes que outras forças, como as eletrostáticas e capilares.

$$F_{vdw} = \frac{Ar}{12z^2} \quad (1)$$

Conforme demonstrado na Equação 1, as forças de Van der Waals são dependentes das propriedades moleculares do material que

constitui a partícula, expresso pela constante de Hamaker (A), do raio da partícula (r) e da distância interparticular (z). Em suma, quanto menor a distância interparticular, mais susceptível às forças de Van der Waals e menor sua capacidade de escoamento. Entretanto, as forças de Van der Waals se tornam irrisórias e são anuladas pela força gravitacional em partículas com tamanho superior a $10\ \mu\text{m}$ (VISSER, 1989; HICKEY et al., 2003), conforme demonstrado na Figura 6. Vale destacar aqui que essa propriedade é dependente da densidade particular, uma vez que partículas extremamente densas estão propensas a fluir melhor quando comparadas a partículas de menor densidade e igual diâmetro.

Figura 6. Forças de Van der Waals em função do diâmetro da partícula.
Adaptado de Hickey e colaboradores (2003).



A área de superfície em relação ao volume é um parâmetro relevante às propriedades mecânicas de pós uma vez que, quanto maior a área de superfície das partículas, maior o seu contato interparticular e, portanto, mais forças interparticulares atuarão na partícula. Por essa razão, o formato da partícula também se torna um parâmetro importante. Desta forma, partículas esféricas usualmente apresentam menor área de contato interparticular quando comparadas às partículas irregulares, como aquelas em formato de flocos ou agulhas, e assim apresentam maior escoabilidade (CROWDER; HICKEY, 2000).

Além disso, as forças capilares também são bastante importantes, em especial no que tange partículas higroscópicas, e

influem diretamente na redução da escoabilidade do produto particulado. As forças capilares ocorrem em decorrência da condensação de vapor de água entre as partículas, o que permite a formação de pontes líquidas interparticulares, que promovem a atração particular por capilaridade. Este mecanismo também promove o aumento nas forças de Van der Waals, em decorrência da redução da distância interparticular, pois as partículas são atraídas umas às outras por capilaridade (CROWDER; HICKEY, 2000; HICKEY et al., 2003).

Outro parâmetro de grande importância na interação particular são as cargas de superfície das partículas. Em geral, as forças eletrostáticas influenciam o comportamento mecânico das partículas de forma direta, por repulsão e atração, e indireta, por modificar as forças de Van der Waals que atuam no sistema, por meio da aproximação ou distanciamento das separações interparticulares. Por exemplo, uma mistura física entre partículas com cargas positivas e negativas levará à formação de um pó com alta coesividade e baixa escoabilidade, em decorrência das interações eletrostáticas e aumento das forças de Van der Waals resultantes da redução da distância interparticular (HICKEY et al., 2003).

Sendo assim, é possível notar que diversas forças atuam na partícula e podem significativamente influenciar o comportamento mecânico de pós. Para que um pó, inicialmente em estágio estacionário, entre em movimento, as partículas precisam individualmente superar as forças interparticulares que as mantêm juntas, aumentando a distância interparticular e permitindo que a mobilidade ocorra. O processo de escoamento de um pó é constituído basicamente de quatro estágios: sólido plástico, inercial, de fluidificação e suspensão (CROWDER; HICKEY, 2000). Inicialmente, ao submeter a mistura de partículas à uma inclinação inferior ao seu ângulo de repouso estático, a distância interparticular aumenta por ação da gravidade, mas ainda não é suficiente para promover movimento no sistema. Caso a inclinação seja igual ou levemente superior ao ângulo de repouso, o sistema entra em estado inercial onde ocorre um maior distanciamento das partículas, até o ponto onde as forças interparticulares são superadas e o pó entra em estágio de fluidificação, alcançando o estágio de suspensão caso o movimento seja muito exacerbado. Em decorrência desta dinâmica, quanto maior as forças interparticulares, menor a capacidade de escoamento do pó, refletida diretamente no aumento do ângulo de repouso deste.

2.1.4 Associação entre micro e macro estruturas para melhoria do produto

Estratégias aplicadas ao melhoramento das características tecnológicas de produtos particulados não são novidade no ramo farmacêutico. Há décadas a indústria farmacêutica aplica princípios de granulação visando transformar pós de baixa fluidez em sistemas particulados com características de fluxo refinadas (AULTON; TAYLOR, 2013). Entretanto, os processos usualmente empregados, tais como as diferentes metodologias de granulação por via seca ou úmida, transformam pós farmacêuticos em produtos com características totalmente diferenciadas, sendo que a estrutura final obtida é responsável pela modificação da liberação do insumo ativo da forma farmacêutica. Por essa razão, estes processos não são adequados para incorporação de partículas micro ou nanométricas de liberação controlada, uma vez que alteram a funcionalidade destas, seja no âmbito da liberação do insumo ativo ou da interação destas partículas com membranas biológicas.

Com o crescente uso de micro e nanopartículas no desenvolvimento de medicamentos, é esperado também um grande crescimento nos estudos de estratégias tecnológicas para o melhoramento das propriedades mecânicas destes produtos. Por essa questão, é possível verificar o surgimento, aos poucos, de trabalhos com essa finalidade. Entretanto, de forma mais significativa, nota-se na última década um crescimento no número de patentes que associam micro e macroestruturas de liberação controlada (NUWAYSER; NUCEFARA, 1986; AUDI; MELLO, 2000; SHINBACH; BARAN, 2008; MAO; YANIV, 2010; QUINTANAR et al., 2011; LIZIO et al., 2013; LERNER et al., 2014). Esse crescimento demonstra o interesse do setor industrial no desenvolvimento e proteção desse tipo de conhecimento.

Recentemente, foi reportada a preparação de micropartículas contendo nanopartículas de prata pela técnica de secagem por aspersão (TOKÁROVÁ et al., 2013). O carreador em questão foi preparado utilizando quitosana, visando ao uso de suas propriedades mucoadesivas para liberação das nanopartículas de prata com atividade bactericida em mucosas gástricas. Conforme relatado por Tokárová e colaboradores (2013), o produto obtido, com tamanho de partícula na faixa de 10 μm , foi capaz de manter a atividade antibacteriana das nanopartículas carregadas.

Outro foco bastante importante que se tem observado é a incorporação de nanopartículas em sistemas microestruturados para

veiculação pulmonar de fármacos. Sham e colaboradores (2004) descrevem a preparação bem sucedida de sistemas carreadores de lactose contendo nanopartículas de gelatina e de poli (butil cianoacrilato) utilizando a técnica de secagem em torre de aspersão. Os autores obtiveram pós com características de fluidização adequadas para administração pulmonar. Com a mesma finalidade, também é possível encontrar relatos na literatura da preparação de sistemas carreadores semelhantes utilizando outros açúcares, tais como o manitol (MIZOE et al., 2007; HEALY et al., 2014).

Recentemente, Tawfeek e colaboradores (2013) demonstraram a preparação de sistemas carreadores contendo macromoléculas para administração pulmonar, obtidos por secagem em torre de aspersão. Como estratégia tecnológica, os autores prepararam nanopartículas contendo α -quimotripsina como forma de melhorar sua absorção e, posteriormente, secaram as suspensões nanoparticuladas por aspersão para obtenção de macroestruturas com características adequadas para veiculação por via pulmonar.

Já em relação às patentes depositadas em bancos internacionais de propriedade intelectual, diversas estratégias com finalidade de aprimorar as características mecânicas de micro e nanopartículas são adotadas.

A patente americana US4568559A requerida pela Biotek, Inc. (1986) descreve a invenção de um sistema de compósitos de micropartículas aglomeradas em leito fluidizado, por meio da aspersão de polímeros derivados do álcool polivinílico, alcançando tamanho de partícula final de até 1000 μm .

A patente americana US20080152913A1, reivindicada pela 3M Innovative Properties, Co. (2008), descreve a preparação de compostos plurais de partículas com tamanho de 200 μm contendo partículas menores visando à melhora de uma ou mais propriedades, tais como fluxo, compactabilidade e densidade.

Em 2010, uma patente internacional, publicada pela Applied Nanotech Holdings, Inc. (2010) sob número WO2010104710A1, descreve uma técnica para melhoramento das propriedades mecânicas de nanotubos de carbono e de argila por meio da deposição destes na superfície de *pellets* termoplásticos. A técnica se caracteriza pela autodeposição dos nanotubos na superfície dos *pellets* por processamento em moinho de bolas.

No ano seguinte, foi publicada pela Universidad Nacional Autónoma de México (2011) patente número MX2010005803A descrevendo a preparação de revestimentos aquosos em comprimidos,

drágeas, grânulos, *pellets*, microcápsulas, cápsulas de gelatina mole ou dura, sistemas de controle de liberação, dispositivos médicos ou qualquer outro substrato das áreas farmacêutica, química, alimentícia e cosmética. O revestimento em questão consiste na combinação de nanopartículas lipídicas sólidas com polímeros solúveis ou insolúveis, para obtenção de filmes que melhoram a estética e as características mecânicas do produto.

Em seguida, foi publicada a patente americana número US8568778B2, de autoria da Evonik Röhm GmbH. (2013), que descreve a preparação de *pellets* de 50 a 2500 µm de diâmetro. Os *pellets* em questão são constituídos de um núcleo matricial contendo nanopartículas, revestido por polímeros ou copolímeros de caráter aniônico com finalidade mucoadesiva.

A mais recente patente de interesse, requerida pela Teva Pharmaceutical Industries, Ltd. (2014) sob número US8663703B2, descreve a preparação de sistemas carreadores de amido, lactose ou celulose microcristalina com micro e nanopartículas (100 nm a 10 µm), depositadas na superfície fazendo uso de agentes sublimantes.

Desta forma, conforme é perceptível, existe um crescente interesse na indústria, expresso pelo número de patentes requeridas na área, por técnicas que permitam a associação de partículas de baixa granulometria com partículas maiores, obtendo assim sistemas mais robustos, com melhores propriedades tecnológicas.

2.2 *Cecropia glaziovii* Snethl. COMO ESPÉCIE VEGETAL DE INTERESSE FARMACÊUTICO

Cecropia glaziovii Snethl. (Urticaceae) é uma espécie de árvore neotropical de grande distribuição na mata atlântica brasileira (FRANCO-ROSSELLI; BERG, 1997; BERG; ROSSELLI, 2005) e nas matas andinas, em especial no Peru e Colômbia (FRANCO-ROSSELLI; BERG, 1997). Essa árvore, popularmente conhecida como embaúba-vermelha, caracteriza-se por sua altura elevada, galhos ocos e ocupação por formigas do gênero *Azteca* (BERG; ROSSELLI, 2005). Além disso, suas folhas, de coloração avermelhada, são responsáveis pelo seu nome popular e são uma importante característica morfológica para sua diferenciação em relação às outras espécies do gênero.

Em decorrência da sua vasta distribuição geográfica e riqueza fitoquímica, essa espécie é empregada popularmente na medicina tradicional brasileira para o tratamento da asma, hipertensão e também como agente diurético (LORENZI; MATOS, 2008). Em decorrência do seu potencial fitoterapêutico, crescentes são os estudos que avaliam e

comprovam as atividades farmacológicas dessa e de outras espécies do gênero *Cecropia*.

2.2.1 Farmacologia

Dentre os estudos publicados na literatura que descrevem diversas atividades farmacológicas para extratos preparados a partir de folhas de *C. glaziovii*, podemos citar como mais relevantes aqueles que demonstram sua atividade anti-hipertensiva (LIMA-LANDMAN et al., 2007), efeito de inibição da bomba gástrica de prótons (SOUCCAR et al., 2008), broncodilatação (DELARCINA JR. et al., 2007), hepatoproteção (PETRONILHO et al., 2012) e as atividades anti-HSV1 (vírus Herpes simplex 1) (SILVA et al., 2010; PETRONILHO et al., 2012), tipo-antidepressiva (ROCHA et al., 2007) e tipo-ansiolítica (ROCHA et al., 2002).

Lima-Landman e colaboradores (2007) descreveram a atividade anti-hipertensiva de extrato aquoso de folhas de *C. glaziovii* a 2 % (m/v) de matéria-prima vegetal (m/v) e da fração butanólica semipurificada desse extrato. Os autores concluem que tanto o extrato aquoso quanto sua fração reduziram a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos em intensidades semelhantes (0,5 g/kg, v.o.). Entretanto, a fração butanólica apresentou ação mais rápida. Ao estudar o mecanismo de ação dos extratos, verificou-se que o efeito anti-hipertensivo não está associado à inibição da enzima conversora de angiotensina, mecanismo comum a grande parte dos fármacos com atividade anti-hipertensiva.

Outro estudo bastante importante demonstra o potencial de extratos de *C. glaziovii* em promover ação antiácida por meio da inibição da bomba de prótons (SOUCCAR et al., 2008). Nesse estudo, foram avaliados o extrato aquoso (2 %; m/v) e sua fração butanólica, preparado a partir de folhas de *C. glaziovii*. Verificou-se uma redução expressiva na acidez estomacal total em camundongos na dose de 1 g/kg para a fração butanólica. No ensaio *in vitro* para atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase, notou-se que a fração butanólica apresentou forte potencial à sua inibição ($CI_{50} = 58,8 \mu\text{g/mL}$). Além disso, pré-tratamento dos camundongos com a fração butanólica (0,05 – 0,5 g/kg) promoveu redução na ulceração induzida pela administração oral de álcool etílico.

Ao avaliar o mesmo extrato de *C. glaziovii* (2 %; m/v) e sua fração butanólica em modelo de broncoespasmo histamina-induzido em *Cavia porcellus* (DELARCINA JR. et al., 2007), notou-se um forte potencial desta espécie como agente broncodilatador. Após administração de 1 g/kg (v.o.) de extrato aquoso, a quantidade de histamina necessária para indução de um broncoespasmo foi 10 vezes

maior quando comparada ao controle. Já em relação à fração butanólica, uma dose de 0,1 g/kg (v.o.) acarretou na necessidade de uma concentração duas vezes maior de histamina. Os estudos *in vitro* indicam que este efeito é decorrente da atividade β -adrenérgica promovida pelo extrato.

Em relação ao efeito hepatoprotetor de extratos de *C. glaziovii*, Petronilho e colaboradores (2012) demonstraram seu potencial por meio do modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos. O extrato foi preparado com folhas de *C. glaziovii* em sistema hidroetanólico 40 °GL e seco. Verificou-se então que a administração peritoneal de 20 mg/kg do extrato foi suficiente para inibir a peroxidação lipídica no fígado, pós-tratamento com CCl_4 , reduzindo as concentrações séricas dos marcadores alanina e aspartato aminotransferase, indicadores de dano hepático. O mesmo extrato foi avaliado em relação à sua capacidade anti-herpética contra a cepa 29R aciclovir-resistente do Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) (PETRONILHO et al., 2012), apresentando ótima seletividade e CI_{50} de 40 $\mu\text{g/mL}$.

Outro estudo publicado recentemente também explora o potencial desta espécie na terapêutica anti-herpética (SILVA et al., 2010). Nesse trabalho, foi avaliado o mecanismo *in vitro* pelo qual o extrato de *C. glaziovii* atua em duas cepas do vírus: HSV-1 e -2. A fração enriquecida de flavonoides C-glicosídeos apresentou os melhores valores de CI_{50} , sendo eles 19,1 e 37,3 $\mu\text{g/mL}$ para os vírus tipo 1 e 2, respectivamente. Em relação ao HSV-2, a fração atua reduzindo a infectividade viral. Já em relação ao HSV-1, nota-se uma inibição na entrada viral nas células, assim como na transmissão célula-célula do vírus.

Foi demonstrado também que *C. glaziovii* apresenta atividade no sistema nervoso central. Rocha e colaboradores (2002) avaliaram o extrato aquoso de folhas de *C. glaziovii*, assim como sua fração butanólica, no que tange à atividade ansiolítica no modelo de cruz elevada com camundongos. Os animais foram tratados em regime agudo (0,25 – 1 g/kg; v.o.) e repetido (24, 7 e 1,5 h antes do experimento) com extratos em doses de 0,025 – 0,1 g/kg (v.o.). O tratamento agudo com extrato aquoso não apresentou resultado, entretanto aqueles tratados com doses sucessiva apresentaram aumento no número de entradas nas porções abertas do aparato, em doses de 0,5 g/kg. Já para a fração butanólica, verificou-se que o tratamento repetido surtiu efeito na dose de 0,1 g/kg. Os resultados apresentados neste estudo indicam novas perspectivas para o uso de *C. glaziovii* como fitomedicamento, uma vez

que não há relatos de uso popular desta espécie para tratamento de distúrbios de origem neurobiológica.

Posteriormente, Rocha e colaboradores (2007) também descrevem a atividade tipo-antidepressiva dos extratos desta espécie. O extrato aquoso de folhas de *C. glaziovii* gerou redução no tempo de imobilidade no teste do nado forçado com ratos nas doses de 0,25, 0,5 e 1 g/kg, sem alterar a atividade locomotora dos animais. A fração butanólica, por sua vez, teve uma atividade ainda melhor, apresentando redução no tempo de imobilidade na dose de 50 mg/kg. A análise bioquímica do tecido do hipocampo revelou um aumento significativo no nível de monoaminas. Por meio de ensaios *in vitro*, os autores também demonstraram que o mais provável mecanismo de ação do extrato de *C. glaziovii* é decorrente da inibição da recaptação das monoaminas no sistema nervoso central.

2.2.2 Ácido clorogênico e ácido cafeico

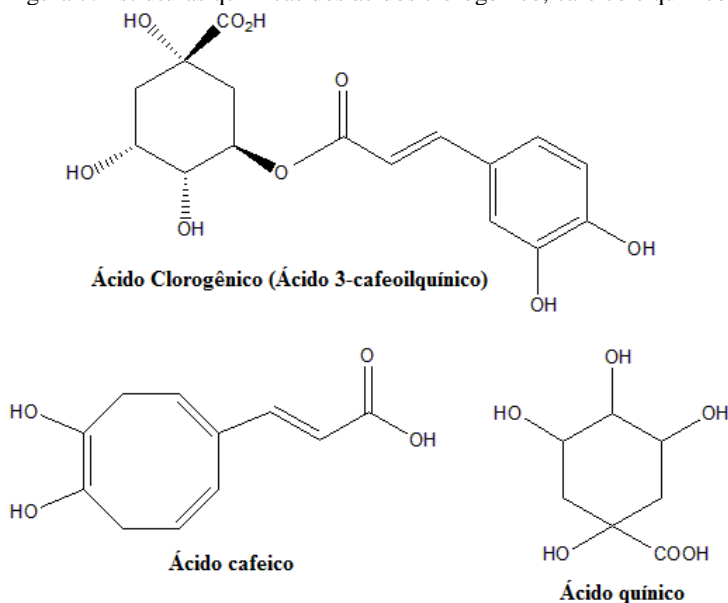
Em se tratando de extratos vegetais, é comum nomear algumas substâncias presentes como marcadores químicos com finalidade de controle de qualidade dos produtos e processos na cadeia de produção de um fitomedicamento (LI et al., 2008). A determinação de um marcador químico está relacionada a diversos fatores e, preferencialmente, mas não obrigatoriamente, à atividade farmacológica pretendida ao fitomedicamento.

No caso da espécie *C. glaziovii*, diversos marcadores foram estudados como possíveis substâncias de interesse para controle de qualidade, tais como: ácido clorogênico (AREND et al., 2011; COSTA et al., 2011), ácido cafeico (AREND et al., 2011), isoorientina, orientina e isovitexina (COSTA et al., 2011). Dentre essas substâncias, os ácidos clorogênico e cafeico são de bastante interesse por serem compostos majoritários em extratos hidroetanólicos de *C. glaziovii* (AREND et al., 2011). Além disso, estas são substâncias conhecida e bioativas no que tange diversas atividades, tais como atividade tipo-antidepressiva (TAKEDA et al., 2002), tipo-ansiolítica (BOUAYED et al., 2007), anti-hiperlipidêmica (CHO et al., 2010) e hipoglicemiante (HEMMERLE et al., 1997; HUANG; SHEN, 2012). Dessa forma, por serem substâncias majoritárias dos extratos hidroetanólicos de *C. glaziovii* e por apresentarem atividade biológica, essas são de grande interesse como marcadores químicos no desenvolvimento de produtos fitofarmacêuticos à base dessa espécie.

Quimicamente falando, o ácido clorogênico e o ácido cafeico estão intrinsecamente ligados ao metabolismo secundário vegetal. O

ácido clorogênico é, na realidade, um éster do ácido cafeico e do ácido quínico (Figura 7). Nas plantas, esses compostos são importantes precursores na via da biossíntese da lignina (LEPELLEY et al., 2007), macromolécula cuja função é conferir rigidez e resistência aos tecidos vegetais.

Figura 7. Estruturas químicas dos ácidos clorogênico, cafeico e quínico.



Em relação à farmacocinética e farmacodinâmica desses ácidos fenólicos, existem diversas informações conflitantes na literatura. Por muito tempo, acreditou-se que o ácido clorogênico apresentava baixíssima biodisponibilidade, sofrendo quebra da ligação éster por esterases de bactérias da biota do intestino delgado e, portanto, sendo absorvido majoritariamente na forma de ácido cafeico (LAFAY et al., 2006). Entretanto, foi demonstrado por Farah e colaboradores (2008), por meio de estudos de biodisponibilidade em humanos, que o ácido clorogênico é absorvido na sua forma original. Entretanto, a sua biodisponibilidade apresentou alto grau de variação entre indivíduos, na faixa de 7,8 a 72,1 %. O ácido clorogênico, independente do isômero, teve biodisponibilidade média de 33,1 %. Os autores também determinaram que somente 4,4 % do ácido clorogênico administrado sofreu hidrólise em ácido cafeico.

Conforme demonstrado, existe grande divergência em relação aos dados farmacocinéticos destes ácidos fenólicos. Até o presente momento, não existe consenso em relação a esta questão.

2.3 APLICAÇÃO DE DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS COMO FERREAMENTA QUIMIOMÉTRICA

Nas ciências farmacêuticas, é comum se deparar com experimentos que requerem a avaliação de um grande número de variáveis a fim de conhecer o comportamento de um sistema e, dessa forma, determinar as melhores condições experimentais para os fins propostos. Usualmente, são empregados métodos que exploram uma variável por vez na experimentação científica. Tais abordagens acarretam em elevado número de experimentos e baixa relação custo-benefício referente à quantidade de informações extraídas dos experimentos (MYERS et al., 2009). Entretanto, existe uma forte tendência ao uso de metodologias para o delineamento experimental racional, tais como planejamentos fatoriais e de metodologia de superfície de resposta (ARMSTRONG, 2006; MYERS et al., 2009). Mais recentemente, também se tem empregado técnicas de inteligência artificial por meio da implementação de redes neurais (SUTARIYA et al., 2013), utilizando algoritmos avançados, tais como o algoritmo de propagação reversa, como forma de entendimento e predição de experimentos. A adoção dessas técnicas estatísticas e matemáticas permite assim reduzir o número de experimentos e extrair o máximo de informações possível, algo crucial em especial nas ciências farmacêuticas, onde os custos de pesquisa e desenvolvimento costumam ser bastante elevados (ARMSTRONG, 2006).

A aplicação correta dos planejamentos experimentais é diretamente dependente do tipo de informação que se procura obter com o delineamento. Um delineamento bem estabelecido se inicia com o conhecimento do domínio experimental, ou seja, a região que se deseja estudar. Para a determinação do domínio experimental, pode-se usar como base dados publicados na literatura ou até mesmo executar uma triagem de fatores utilizando metodologias adequadas, tais como os planejamentos fatoriais completos e fracionados (ANTONY, 2014).

Quando já se conhece bem o domínio experimental, seja por informações prévias ou como resultado de um delineamento de triagem, podem-se empregar metodologias mais complexas, tais como a metodologia de superfície de resposta, que permitem a construção de modelos matemáticos empíricos utilizando modelagem por mínimos quadrados e, por fim, a otimização do experimento.

Nesse trabalho, termos como “fatores” ou “variáveis independentes” se referem às condições experimentais (por exemplo, temperatura de processamento), sendo que o conjunto dos fatores constitui o “domínio experimental” avaliado. Por sua vez, termos como “respostas” ou “variáveis dependentes” se referem à condição resultante da variação dos fatores (por exemplo, marcador químico extraído).

2.3.1 Planejamento Fatoriais

Os planejamentos experimentais do tipo fatorial são os mais comuns quando a finalidade é triagem e conhecimento inicial da influência dos fatores nas respostas. Dentre esses, pode-se trabalhar com planejamentos fatoriais completos, quando o número de fatores analisados é reduzido (geralmente menor que cinco) e já se imagina que esses serão importantes nas respostas avaliadas, ou também se pode trabalhar com fatoriais fracionados. Os planejamentos fatoriais fracionados são mais adequados quando se deseja triar um número alto de variáveis, mas também se deseja reduzir o número de experimentos. Nesse tipo de abordagem, a redução de experimentos também acarreta na redução da resolução do planejamento, ou seja, ele fornecerá menos informações quando comparado a um planejamento fatorial completo (ANTONY, 2014). Entretanto, ressalta-se aqui a finalidade de um planejamento fatorial, a qual é fornecer informações preliminares ao experimento para posteriormente implantar um delineamento mais avançado. Dessa forma, usualmente a perda de resolução não é um problema significativo, uma vez que não compromete a finalidade do planejamento experimental.

Em relação aos planejamentos fatoriais completos, os mais comuns são aqueles que triam os fatores em dois níveis extremos, o inferior e superior, usualmente codificados por -1 e +1, respectivamente. Esses planejamentos são usualmente denominados planejamentos 2^n , onde n é o número de fatores avaliados (ARMSTRONG, 2006; MYERS et al., 2009; ANTONY, 2014). Ao resolver essa potência, encontra-se o número mínimo de experimentos necessários para esse planejamento. Ou seja, em um experimento envolvendo três fatores, a potência 2^3 resulta em 8 experimentos mínimos. Além disso, é necessário realizar repetições de alguns experimentos para determinação do erro intrínseco do planejamento, caso contrário não será possível determinar as relevâncias estatísticas por análise de variância (ARMSTRONG, 2006).

Os planejamentos fatoriais fracionados, por sua vez, são empregados quando o número de experimentos necessário para a execução de um delineamento completo não é justificável, seja por custo

ou tempo (VAN BERKUM et al., 2005). Nesses casos, reduz-se o número de experimentos em detrimento da capacidade resolutive do planejamento. Esse tipo de metodologia usualmente responde pela nomenclatura 2^{n-k} , onde n é o número de fatores e k é o fator de redução (ARMSTRONG, 2006; MYERS et al., 2009). Dessa forma, por exemplo, um planejamento 2^{3-1} avaliará três fatores com somente quatro experimentos mínimos. Esse tipo de planejamento sofre o chamado efeito *alias* (BUTLER, 2005; MYERS et al., 2009), ou seja, alguns coeficientes podem estar correlacionados com outros, não sendo possível esclarecer qual é o fator verdadeiramente responsável pelo efeito observado. Em função desse efeito, aos planejamentos fracionados é atribuído um índice de resolução, o qual indica quais termos estão correlacionados e não poderão ser avaliados na totalidade (BUTLER, 2005). Por exemplo, resolução III indica que os termos primários estarão relacionados com as interações secundárias. Já para um planejamento com resolução IV, as interações de terceiro grau estarão correlacionadas aos termos primários e as interações secundárias estarão relacionadas entre si. Já a resolução V indica que somente as interações quaternárias estarão correlacionadas, logo, é possível estimar tanto os termos primários quanto as interações secundárias e terciárias. Em geral, quanto maior a resolução do planejamento, menor a influência do efeito *alias*. Como norma geral, evita-se ao máximo o uso de planejamentos resolução III uma vez que estes apresentam baixíssima capacidade resolutive. Os planejamentos resolução IV são empregados com cautela, somente em situações de triagem de variáveis. Já aqueles de resoluções maiores ou iguais a V podem ser empregados livremente uma vez que são raros os sistemas que apresentam interações quaternárias ou maiores.

De forma geral, os planejamentos fatoriais são ótimos planejamentos de triagem, permitindo determinar quais fatores apresentam maior relevância frente às respostas analisadas e, assim, reduzir o número de fatores para posterior otimização. A partir dos delineamentos experimentais descritos, é possível traçar modelos matemáticos que descrevem o experimento. As equações em questão são expressas a partir da equação base 2 tendo como ponto de partida os termos codificados de -1 a +1 pela aplicação de análise de regressão linear múltipla (MYERS et al., 2009):

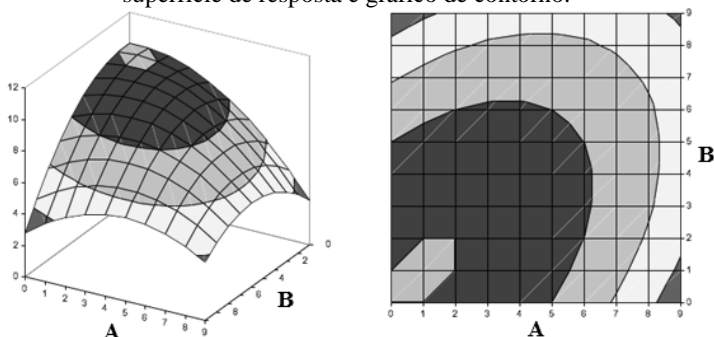
$$W = \beta_0 + \beta_1 * A + \beta_2 * B + \beta_3 * AB \quad (2)$$

Onde, W é a resposta avaliada, β_0 é o intercepto do modelo, β_1 e β_2 são os coeficientes dos fatores primários A e B, β_3 é o coeficiente da interação secundária entre os fatores AB. Nesse caso, não é possível avaliar termos quadráticos no modelo uma vez que não foram avaliados níveis intermediários no domínio experimental.

2.3.2 Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), ou *Response Surface Methodology*, é uma técnica multifatorial baseada nos mesmos princípios dos planejamentos experimentais fatoriais. Essa metodologia foi inicialmente introduzida na década de 50 (BOX; WILSON, 1951) e desde então tem sido aprimorada e empregada em diversos ramos da pesquisa e, mais recentemente, na área farmacêutica. A MSR basicamente adiciona diversos pontos intermediários no domínio experimental de tal forma que se permita traçar um gráfico de superfície em função do comportamento das respostas, aqui denominado simplesmente “superfície de resposta”, também descrito na forma de gráfico de contorno (Figura 8) (MYERS et al., 2009). Essa metodologia também permite determinar coeficientes para fatores por regressão linear de forma muito mais precisa, o que não é observado em planejamentos fatoriais convencionais, uma vez que grande parte dos fenômenos químicos e físicos não apresentam um comportamento totalmente linear. Além disso, diversos algoritmos foram desenvolvidos para melhorar a eficiência desse tipo de planejamento, seja qual for o objetivo pretendido: otimização ou conhecimento mais profundo do domínio experimental (JONES; GOOS, 2012; SAMBO et al., 2014).

Figura 8. Representação das formas gráficas de apresentação para a metodologia de superfície de resposta. Da esquerda para direita, gráfico de superfície de resposta e gráfico de contorno.



Na MSR, parte-se da premissa que já se tem conhecimento prévio do domínio experimental por conta de dados disponíveis na literatura, conhecimento próprio ou pela execução de um planejamento de triagem. A partir dessa premissa, realiza-se o deslocamento do domínio experimental. Caso, pelas informações prévias, sabe-se que a resposta ainda não alcançou o patamar desejado, será necessário deslocar o domínio experimental para explorar a região onde se acredita que o “ponto ótimo” se encontrará.

A partir do delineamento experimental MSR, é possível traçar modelos matemáticos que descrevem o experimento. As equações em questão são expressas a partir da Equação 3, tendo como ponto de partida os termos codificados de -1 a +1, pela aplicação de análise de regressão linear múltipla (MYERS et al., 2009):

$$W = \beta_0 + \beta_1 * A + \beta_2 * B + \beta_3 * AB + \beta_4 * A^2 + \beta_5 * B^2 \quad (3)$$

Onde, W é a resposta avaliada, β_0 é o intercepto do modelo, β_1 e β_2 são os coeficientes dos fatores primários A e B , β_3 é o coeficiente da interação secundária entre os fatores AB . Diferente dos planejamentos fatoriais, a metodologia de superfície de resposta permite a determinação de termos quadráticos, uma vez que avalia diversos níveis dentro do domínio experimental, sendo assim: β_4 e β_5 são os coeficientes dos termos quadráticos para A^2 e B^2 , respectivamente.

2.3.3 Algoritmos tipo *Optimal*

Na preparação de um planejamento do tipo MSR, existem disponíveis diversos algoritmos que ajustam a matriz experimental matematicamente para satisfazer algumas necessidades específicas. Esses algoritmos são usados para calcular quais pontos intermediários são necessários realizar para posterior cálculo de regressão linear e propiciam diversas vantagens em relação aos delineamentos tradicionais. Dentre os algoritmos disponíveis, os mais populares são os D e IV-*Optimal*.

O algoritmo D-*Optimal* tem como finalidade a redução da variância na determinação dos coeficientes dos fatores individuais, ou seja, permite conhecer melhor a magnitude da influência de cada fator e suas interações na resposta analisada (JONES; GOOS, 2012; SAMBO et al., 2014).

Por sua vez, o algoritmo IV-*Optimal* (também chamado somente de I-*Optimal*) reduz a variação nos valores preditos pelo modelo matemático, permitindo assim um processo de otimização mais confiável (JONES; GOOS, 2012; SAMBO et al., 2014).

2.3.4 Algoritmos de otimização

Dentre os métodos disponíveis para otimização, podemos considerar os métodos sequenciais e os simultâneos (ARMSTRONG, 2006). Os métodos sequenciais são adotados em planejamentos do tipo Simplex, onde um pequeno número de experimentos é realizado e o domínio experimental é deslocado à medida que se realiza os experimentos. Como comparação, Armstrong (2006) comparou esses métodos com a escalada de uma montanha com baixa visibilidade, onde o topo da montanha será alcançado passo a passo, determinando aos poucos qual direção tomar. Os métodos de otimização simultânea, por sua vez, trabalham a partir de um conjunto de experimentos pré-definidos, onde é traçado um modelo matemático por meio de regressão linear, permitindo assim o cálculo do ponto ótimo. Desta forma, delineamentos como a MSR são desenhados para processos de otimização simultâneos, enquanto planejamentos do tipo Simplex são desenhados para otimização sequencial (MYERS et al., 2009).

Em relação à otimização simultânea, a partir do momento que se tem o modelo matemático traçado por regressão linear múltipla, pode-se iniciar o processo de otimização, visando obter as melhores condições experimentais de acordo com o desejado. O processo de otimização é bastante delicado e usualmente envolve a predição de condições que, embora dentro do domínio experimental, não foram realizadas experimentalmente. Dessa forma, esses processos só devem ser realizados fazendo uso de delineamentos com alto poder preditivo, tais como a MSR. Planejamentos de triagem tipo fatorial, embora usualmente envolvam três níveis por fator (dois extremos e um central: -1, 0 e +1), não apresentam capacidade preditiva suficiente para permitir um processo de otimização confiável, a não ser que tenham sido preparados com essa finalidade, empregando algoritmos tipo *Optimal*, por exemplo.

Desta forma, existem diversas estratégias para otimização utilizando modelos matemáticos. Dentre as mais simples, pode ser feita a determinação do ótimo diretamente pela análise dos gráficos de contorno desenhados para os modelos matemáticos ou os pontos desejados podem ser diretamente calculados. Dentre as estratégias mais avançadas, existem a otimalidade de pareto (SÁNCHEZ et al., 2012) e,

mais comumente empregada, a função desejabilidade (ARMSTRONG, 2006).

A função desejabilidade, do inglês *desirability function*, é bastante útil quando se deseja otimizar mais de duas respostas simultaneamente, o que é bastante desafiador de ser feito por meio da simples análise dos gráficos de contorno. Essa função, descrita inicialmente por Derringer e Suich (1980), calcula índices de desejabilidade individuais para cada resposta na escala de 0 a 1, sendo 1 o mais próximo do valor ideal. Os valores ideais são definidos para cada resposta com base no objetivo do experimento. Por exemplo, se o objetivo for maximizar uma resposta, o valor ideal será o maior valor alcançado no domínio experimental. Por fim, todos os índices individuais d são incorporados em um índice de desejabilidade global D , o qual representa o quanto as condições experimentais trabalhadas satisfazem os pré-requisitos para todas as respostas, conforme a equação a seguir:

$$D = \sqrt[m]{d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m} \quad (4)$$

Onde, D é a desejabilidade global, d é a desejabilidade individual e m é o número de respostas envolvidas.

Para o cálculo da função desejabilidade individual para cada resposta, são levados em considerações os pesos atribuídos, os quais corrigem a desejabilidade em função da importância que esta resposta apresenta no todo. Dessa forma, é possível priorizar algumas respostas em detrimento de outras no processo de otimização. Por fim, a função desejabilidade é calculada virtualmente para todas as condições experimentais possíveis dentro do domínio avaliado e um índice é alcançado com base em todas as condições esperadas.

**Estudo tecnológico do processo de extração por
força de cisalhamento de folhas de
Cecropia glaziovii Snethl.**

3 ESTUDO TECNOLÓGICO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR FORÇA DE CISALHAMENTO DE FOLHAS DE *Cecropia glaziovii* Snethl.

3.1 INTRODUÇÃO

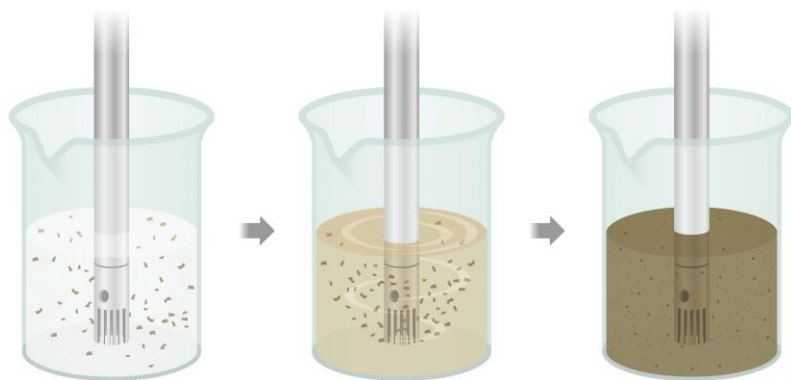
Dentre as diversas etapas na cadeia produtiva de fitoterápicos, uma das mais importantes é o processo de transformação da matéria-prima de origem vegetal em insumo farmacêutico ativo, denominado extrato. A padronização e controle da etapa de extração é primordial para garantir a efetividade e reprodutibilidade dos produtos fitofarmacêuticos, uma vez que estas delimitam a constituição química do produto preparado. O processo de extração é, literalmente, o processo de retirada das substâncias e frações ativas contidas na matéria-prima vegetal, obtendo assim a solução extrativa.

Diversos são os métodos extrativos empregados, dentre eles a maceração e a percolação são os mais utilizados em decorrência da sua simplicidade e baixo custo de execução (SONAGLIO, 2010). Entretanto, a crescente demanda por produtos fitofarmacêuticos leva à necessidade do desenvolvimento de novos métodos extrativos, mais rápidos e eficientes. Neste trabalho, foi avaliado o processo de extração por força de cisalhamento, também conhecido por turboextração. Este método faz uso da força mecânica para facilitar a extração vegetal por dois mecanismos: redução do tamanho de partícula da matéria-prima e quebra das células vegetais (DE SOUZA et al., 2010). A redução do tamanho de partícula facilita o acesso do solvente à matéria-prima vegetal pelo aumento da área de superfície disponível para extração sólido-líquido. Já a quebra das células vegetais facilita o processo de difusão dos componentes químicos do interior das células para o meio extrativo.

O processo de extração por força de cisalhamento pode ser realizado em equipamentos simples, que funcionam de forma semelhante a liquidificadores, ou em ultrahomogeneizadores mais complexos. O último é constituído de um sistema rotor-estator, onde o rotor se localiza na parte interna da haste de extração e promove a sucção mecânica da suspensão planta-solvente por pequenas aberturas do estator fixo (Figura 9). Este processo promove a redução e quebra das partículas em decorrência do cisalhamento mecânico e, assim, permite a preparação de extratos altamente concentrados em um curto período de tempo, quando comparado a métodos tradicionais como a maceração (DE SOUZA et al., 2010).

Neste capítulo, a preparação de extratos de *C. glaziovii* por força de cisalhamento é abordada. O processo extrativo é caracterizado e estudado minuciosamente, uma vez que não existem dados na literatura que demonstrem quais são os parâmetros importantes na operação de turboextração. Como objetivo, propõe-se a obtenção de um extrato vegetal seco, biomonitorado no que tange à atividade tipo-antidepressiva, para ser utilizado como insumo-modelo na preparação de microesferas de liberação prolongada. A escolha por um extrato vegetal como modelo foi feita em decorrência da alta higroscopicidade deste tipo de produto no estado sólido (EMERY et al., 2009), o que torna este mais susceptível às forças interparticulares que afetam as propriedades mecânicas dos pós (CROWDER; HICKEY, 2000). Ao utilizar como insumo modelo um extrato higroscópico, visa-se demonstrar que o sistema multiparticulado desenvolvido neste trabalho é capaz de contornar problemas de escoabilidade decorrentes da formação de ligações capilares interparticulares, usuais em produtos particulados higroscópicos.

Figura 9. Representação do processo de preparação de extratos vegetais por extração por força de cisalhamento.



3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Os seguintes materiais, reagentes e solventes foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho: álcool etílico absoluto e ácido trifluoracético (Vetec, Brasil); metanol e acetonitrila grau CLAE (J.T. Backer, EUA); ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico) e ácido

cafeico padrões primários (Sigma-Aldrich, EUA); polissorbato 80 (*Tween* 80) e bupropiona (Sigma-Aldrich, EUA). Todas as soluções foram preparadas com água destilada, com exceção daquelas usadas para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), onde se usou água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

3.2.2 Processamento da matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal utilizada foram folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl. As folhas foram adquiridas secas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em Campinas (SP). A identificação botânica da espécie vegetal foi realizada durante coleta e o *voucher* de identificação (número 78) encontra-se depositado no herbário do CPQBA.

As folhas foram processadas em moinho de facas (Macmount, EUA) com retenção em malha de 3,0 mm. A matéria-prima moída resultante deste processo foi empregada na preparação dos extratos vegetais nesse estudo.

3.2.3 Equipamento cromatográfico

As análises em CLAE foram realizadas empregando cromatógrafo Perkin Elmer Series 200 dotado dos seguintes módulos: bomba binária, autoinjeter, degaseificador a vácuo e detector espectroscópico ultravioleta-visível (UV-Vis) e de arranjo de diodos (DAD). A fase estacionária empregada foi uma coluna de fase reversa Luna C18(2) com baixo teor de carbono (5 μm , 150,0 x 4,6 mm, 100Å; Phenomenex, EUA) e equipada com sistema pré-coluna C18 (3,0 x 4,0 mm; Phenomenex, EUA).

A detecção ocorreu em comprimento de onda fixo em 320 nm, o qual corresponde ao ponto máximo de absorbância de ambos os marcadores químicos: ácido cafeico (ACF) e ácido clorogênico (ACG). O detector DAD foi empregado somente no desenvolvimento metodológico, para verificação da pureza espectral dos picos e comparação com espectros de padrões analíticos puros.

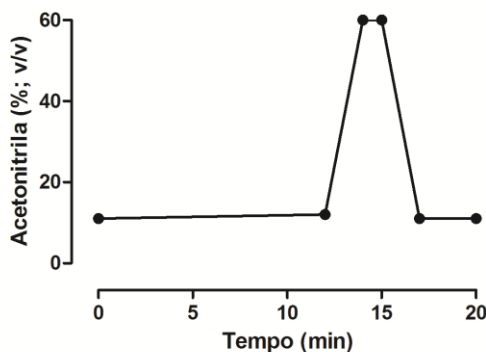
A fase móvel empregada, conforme detalhado no item 3.2.4, foi previamente filtrada em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com tamanho de poro de 0,45 μm (Millipore, EUA) e degaseificada por irradiação ultrassônica. O fluxo da fase móvel foi padronizado em 1,0 mL/min. O volume de injeção de amostra foi fixado em 20,0 μL . Todas as amostras foram filtradas em membranas PVDF antes da análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4 Desenvolvimento da metodologia analítica

Uma triagem de variáveis cromatográficas foi realizada visando alcançar as melhores condições para realização de análises quantitativas dos produtos oriundos de extratos vegetais de *C. glaziovii*. Neste estágio, avaliaram-se diferentes modos de eluição (isocrática, gradiente crescente e gradiente decrescente). Além disso, trabalhou-se com diferentes polaridades na fase aquosa, variando-se a proporção entre acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoracético, assim como a concentração deste.

Como resultado (dados não demonstrados), alcançou-se um conjunto de condições cromatográficas que promove a eluição rápida dos marcadores químicos ACG e ACF em extratos e produtos de *C. glaziovii*, sem prejudicar a resolução entre estes. O método cromatográfico desenvolvido consiste de acetonitrila e ácido trifluoracético 0,05 % (v/v) na proporção 12:88 em gradiente crescente, partindo de um *baseline* em proporção 11:89. O gradiente foi empregado nos primeiros 12 min de análise cromatográfica, garantindo a eluição dos dois marcadores químicos de interesse. Após, foi empregado um gradiente de limpeza, conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10. Gradiente empregado no método em CLAE. Linha de base configurada na proporção 11:89 (v/v) de acetonitrila e ácido trifluoracético 0,05 % (m/v).



3.2.5 Validação da metodologia analítica

O método cromatográfico foi validado de acordo com parâmetros nacionais (ANVISA, 2003) e internacionais (ICH, 2005) de qualidade e

reprodutibilidade de métodos químico-analíticos. Desta forma, avaliaram-se os seguintes parâmetros: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limites de quantificação e de detecção, exatidão e especificidade.

3.2.5.1 Linearidade

Curvas analíticas foram preparadas por meio de diluições volumétricas de soluções dos marcadores químicos de interesse, ACF e ACG, em metanol:água purificada na proporção 1:1 (v/v). As concentrações trabalhadas para os marcadores foram de 1, 2,5, 5, 10, 20, 50, 75, 100 e 200 µg/mL e de 2,5, 5, 10, 20, 50, 75 e 100 µg/mL para o ACG e ACF, respectivamente. As soluções foram filtradas e injetadas conforme descrito na seção 3.2.3. Cada curva foi preparada em triplicata e injetada também em triplicata em dias distintos, visando avaliar os erros intrínsecos à preparação das amostras e ao cromatógrafo.

Por fim, os cromatogramas para cada concentração foram obtidos e as áreas resultantes dos picos foram calculadas. A linearidade foi confirmada por meio do coeficiente de correlação calculado a partir da linha de tendência resultante da correlação entre área do pico e concentração do marcador químico. Para fins analíticos, a equação da reta foi calculada por regressão linear.

3.2.5.2 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ), indicativo da quantidade mínima do analito que pode ser quantificada de forma precisa e exata, foi calculado com base nas curvas analíticas traçadas para cada um dos marcadores químicos. A partir de três curvas analíticas semelhantes, foi determinado o desvio padrão dos interceptos com o eixo Y (σ) e a média das inclinações das curvas (S). Desta forma, calculou-se o LQ por meio da equação:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (5)$$

Da mesma forma, o limite de detecção (LD), indicativo da quantidade mínima do analito que gera resposta de detecção, foi calculado como:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (6)$$

3.2.5.3 Precisão

A precisão, demonstrada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, foi utilizada como indicativo da capacidade do método em reproduzir os resultados obtidos em análises inter e intra-dia.

A repetibilidade do método foi demonstrada por meio da injeção de três concentrações distintas (2,5, 50 e 100 µg/mL), três vezes, em três períodos distintos em um único dia, por dois analistas. Além disso, foi determinada a precisão intermediária, por meio da injeção das mesmas três concentrações em três dias distintos, por dois analistas. Para ambos os parâmetros, a avaliação do desvio padrão relativo dos resultados obtidos para as três injeções, quando menor que 5 %, indica precisão adequada do método.

3.2.5.4 Exatidão

A exatidão é o índice que avalia a concordância entre os valores experimentais obtidos e aqueles que realmente representam a quantidade de analito presente na amostra. Para demonstrar a exatidão do método, foram avaliadas as porcentagens de recuperação do analito após adições de concentrações conhecidas dos marcadores ACF e ACG em diferentes matrizes. Para isso, prepararam-se extratos de *C. glaziovii* pela técnica de extração por força de cisalhamento (seção 3.2.6). Aos extratos previamente quantificados, foram adicionadas soluções de ACG e ACF de tal forma que a concentração final correspondesse a 125, 150 e 175 % da concentração inicial. As amostras contaminadas foram quantificadas e a porcentagem de analito recuperado foi calculada.

3.2.5.5 Especificidade

A especificidade do método foi investigada por meio do monitoramento dos espectros no ultravioleta dos picos de interesse, fazendo uso do detector de arranjo de diodos. Os espectros observados para os cromatogramas dos extratos foram comparados àqueles dos padrões analíticos para determinação da pureza espectral dos picos.

3.2.6 Extração por força de cisalhamento

A extração por força de cisalhamento foi realizada em equipamento ultrahomogeneizador Ultra-turrax® modelo T25 Basic (IKA, Alemanha). A haste dispersora modelo S25N-10G (IKA, Alemanha) utilizada consiste de um sistema rotor-estator de alta velocidade. Os diâmetros do rotor e do estator são 7,5 e 10,0 mm,

respectivamente. A distância entre o rotor e o estator corresponde a 350 μm .

Para obtenção das soluções extrativas, soluções hidroetanólicas foram preparadas de acordo com o necessário fazendo uso de um densímetro de vidro. Aproximadamente 100 mL da solução hidroetanólica foram transferidos para um bquer de vidro (diâmetro = 5,5 cm, altura = 15,5 cm) contendo a matéria-prima vegetal previamente pesada. A dispersão formada foi levemente agitada visando garantir total umectação da matéria-prima vegetal, reduzindo a quantidade de partículas vegetais aderidas à parede do bquer. A haste dispersora foi posicionada dentro do bquer a uma altura de 1 cm do fundo do mesmo. A extração ocorreu em velocidade e tempo previamente determinados por meio dos delineamentos experimentais, conforme descrito na seção 3.2.7. Após o término do processamento, o resíduo vegetal foi separado da solução extrativa por centrifugação a 2.000 rpm (FCR = 814) por 5 minutos e filtrada em papel filtro de celulose para remoção de resíduos de baixa densidade. As soluções extrativas resultantes foram armazenadas em frascos âmbar a 5 °C para posterior análise.

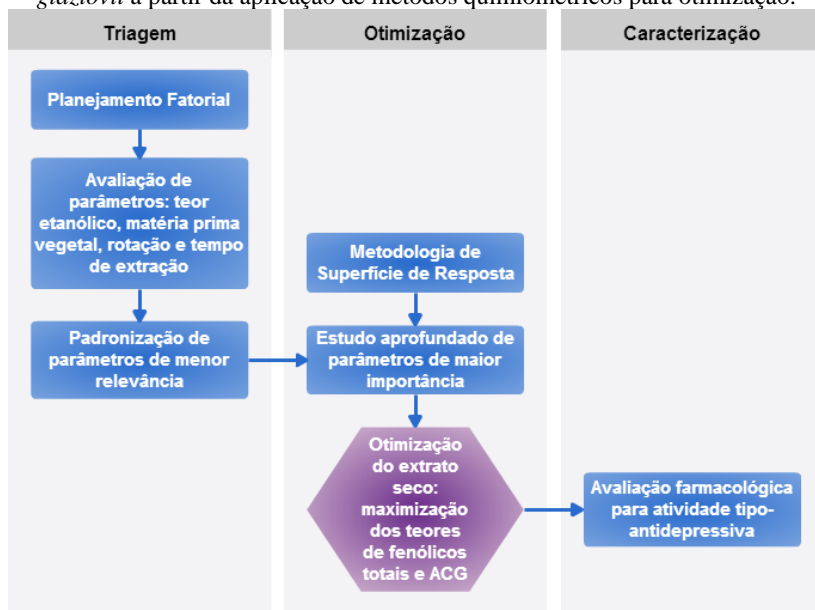
3.2.7 Delineamento experimental

Classicamente, as metodologias de *Design of Experiments* (DOE) podem ser aplicadas sequencialmente com essa finalidade (Figura 11). Inicialmente, optou-se por trabalhar com um delineamento fatorial fracionado para promover a triagem das principais variáveis que se acredita influenciarem em parâmetros fundamentais no processo extrativo por força de cisalhamento. Após a triagem, aplicou-se um delineamento experimental do tipo Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para garantir o aprofundamento do conhecimento no domínio experimental, identificar pequenas variações e curvaturas nas respostas e permitir a definição de equações polinomiais para cálculo e predição de condições ótimas de extração. Como objetivo final, buscou-se a obtenção de extratos concentrados em fenólicos totais e ácido clorogênico no estado sólido, após a secagem por liofilização.

Todos os planejamentos apresentados nesta seção foram analisados fazendo uso do *software* Design-Expert® 8.0.7.1 (Stat-Ease Inc., EUA). As relevâncias estatísticas de termos hierárquicos, interações e termos quadráticos foram determinadas por meio de análise de variância. Fatores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes. Termos não relevantes foram excluídos dos modelos matemáticos polinomiais, a menos que estivessem envolvidos em interações como termos hierárquicos. Foram determinados o coeficiente

de correlação (R^2) para o modelo matemático, assim como o coeficiente de correlação ajustado (R^2 ajustado), o qual demonstra a variação do modelo ajustado ao número de termos que o integram. Para esses dois coeficientes, uma diferença menor que 0,2 é indicativa de ajuste adequado no modelo (MYERS et al., 2009). Para os delineamentos visando à otimização, o coeficiente de correlação preditivo (R^2 preditivo) também foi determinado como um indicativo da variação entre os valores experimentais e os calculados por meio do modelo matemático.

Figura 11. Diagrama do processo de preparação do extrato padronizado de *C. glaziovii* a partir da aplicação de métodos quimiométricos para otimização.



3.2.7.1 Planejamento Fatorial 2^{4-1} para triagem

Nesta etapa do estudo, visando à identificação dos fatores mais importantes no processamento de folhas de *C. glaziovii* pela técnica de extração por força de cisalhamento, optou-se trabalhar com um planejamento fatorial fracionado tipo 2^{4-1} com quatro pontos centrais para estimativa de erro. O planejamento utilizado apresenta uma resolução de ordem IV, indicando que nenhum termo principal estará relacionado entre si ou com interações de segunda ordem, garantindo a

confiabilidade dos resultados obtidos até este nível. Entretanto, as interações de segunda ordem estão relacionadas entre si.

Ao todo, foram executados 12 experimentos variando os seguintes fatores: (A) teor etanólico, em graus Gay-Lussac, (B) matéria-prima vegetal, em gramas por 100 mL de líquido extrator, (C) rotação do sistema rotor-estator, em rotações por minuto, (D) tempo de extração, em minutos. O domínio experimental trabalhado se encontra detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Domínio experimental avaliado no planejamento fatorial 2^{4-1} para triagem de fatores relacionados à extração por força de cisalhamento.

Fator	Níveis		
	Mínimo	Central	Máximo
(A) Teor Etanólico (°GL)	20	55	90
(B) Matéria-prima vegetal (g/100 mL)	5	10	15
(C) Rotação (rpm)	6.500	10.000	13.500
(D) Tempo de extração (min)	1,0	5,5	10,0

Como respostas, foram avaliados: (1) rendimento (mL), (2) variação de temperatura durante processamento do extrato vegetal (°C), (3) resíduo seco (%; m/m), (4) teor de fenólicos totais no extrato bruto (µg/mL), (5) teor de fenólicos totais no resíduo seco (%; m/m), (6) eficiência extrativa de fenólicos totais (mg extraídos por g de matéria-prima vegetal), (7) teor de ácido clorogênico no extrato bruto (µg/mL), (8) teor de ácido clorogênico no resíduo seco (%; m/m), (9) eficiência extrativa do ácido clorogênico (mg extraídos por g de matéria-prima vegetal), (10) consumo energético total durante processamento (watt/hora) e (11) pico de consumo durante processamento (watt). Os procedimentos experimentais associados à coleta de informações relativas a cada uma destas respostas se encontram descritos na seção 3.2.8.

3.2.7.2 Metodologia de Superfície de Resposta para otimização

Com base nos dados obtidos por meio do planejamento fatorial detalhado na seção 3.2.7.1, foi possível restringir o domínio experimental. Dessa forma, fixou-se os níveis dos fatores que apresentavam menos influência nas respostas de maior relevância para o experimento, permitindo explorar mais profundamente aquelas que realmente são de interesse para otimização do processo extrativo.

Neste estágio, optou-se por trabalhar com um planejamento experimental do tipo Metodologia de Superfície de Resposta com processamento algorítimo IV-*Optimal*, visando à redução na variação da capacidade preditiva do modelo matemático a ser estabelecido. Em decorrência dos dados obtidos com o planejamento de triagem, os fatores (C) rotação e (D) tempo de extração foram padronizados em 6.500 rpm e 10 minutos, respectivamente. Dessa forma, neste planejamento de otimização foram estudados somente com fatores (A) teor etanólico e (B) matéria-prima vegetal.

De forma diferenciada, o domínio experimental para os fatores A e B foi restringido próximo ao nível máximo e mínimo, respectivamente, em relação ao previamente avaliado. Entretanto extrapolaram-se estes níveis de tal forma que o “ótimo” pudesse ser alcançado nesse experimento. Sendo assim, o domínio experimental avaliado por meio desse planejamento se encontra descrito na Tabela 2. O planejamento em questão consistiu de 13 experimentos. Avaliou-se cada fator em cinco níveis, o mínimo e máximo e mais três níveis intermediários para determinação de curvatura nas respostas.

Tabela 2. Domínio experimental avaliado na Metodologia de Superfície de Resposta para otimização de fatores relacionados à extração por força de cisalhamento.

Fator	Níveis		
	Mínimo	Intermediários	Máximo
(A) Teor Etanólico (°GL)	80,0	86,7; 90,0; 95,0	100,0
(B) Matéria-prima vegetal (g/100 mL)	2,5	4,2; 5,0; 6,2	7,5

Como respostas, foram avaliados somente os parâmetros mais importantes na otimização do processo, tais como: (1) variação de temperatura durante processamento do extrato vegetal (°C), (2) resíduo

seco (%; m/m), (3) teor de fenólicos totais no extrato bruto ($\mu\text{g/mL}$), (4) teor de fenólicos totais no resíduo seco (%; m/m), (5) teor de ácido clorogênico no resíduo seco ($\mu\text{g/mL}$), (6) teor de ácido clorogênico no resíduo seco (%; m/m). Os procedimentos experimentais associados à coleta de informações relativas a cada uma destas respostas se encontram descritos na seção 3.2.8.

3.2.8 Análise de variáveis dependentes

3.2.8.1 Rendimento

O rendimento do processo foi avaliado por meio de comparação entre o líquido extrativo adicionado no início do processo e o obtido no final. Dessa forma, o rendimento foi calculado como:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(\text{Volume recuperado} \times 100)}{\text{Volume adicionado}} \quad (7)$$

3.2.8.2 Variação de temperatura de processamento

A variação de temperatura de processamento foi monitorada utilizando termômetro de mercúrio graduado. A temperatura inicial foi determinada logo antes da extração. A temperatura final foi determinada assim que o equipamento ultrahomogeneizador foi desligado. A variação de temperatura (ΔT) foi expressa como a diferença entre a temperatura final e a inicial.

3.2.8.3 Resíduo seco

Para determinação do resíduo seco, foi adotada metodologia gravimétrica preconizada pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Resumidamente, cerca de 2 g do extrato bruto foram colocados diretamente em pesa-filtros previamente dessecados em estufa (105°C) e pesados. Os extratos foram levados à secura em banho-maria e transferidos para estufa (105°C) por 3 horas. Os pesa-filtros foram então retirados da estufa e mantidos em dessecador com sílica gel até alcançarem temperatura ambiente. A pesagem foi realizada e o resíduo seco foi expresso em porcentagem em relação ao peso inicial. Cada valor de resíduo seco é resultado da média de três determinações.

3.2.8.4 Teor de fenólicos totais nas soluções extrativas

A determinação do teor de fenólicos totais dos extratos líquidos obtidos foi realizada por meio do método colorimétrico de Folin-

Ciocalteau, conforme descrito previamente por Yu e colaboradores (2002) com pequenas modificações.

Resumidamente, 20 µL de cada solução extrativa foram diluídos em 2 mL de água purificada. À diluição, adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 1N e a solução resultante foi mantida em agitação por 1 min ao abrigo da luz. Adicionaram-se 2 mL de uma solução de carbonato de sódio 20 % (m/v) para alcalinizar o meio e permitir a redução dos ácidos do reagente de Folin-Ciocalteau. Por fim, o volume foi completado para 10 mL em balão volumétrico. A reação foi mantida por 2 horas ao abrigo da luz para garantir total formação dos óxidos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800, Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 765 nm.

Para efeito de quantificação, foi preparada uma curva analítica com ácido gálico na faixa de 50 a 500 µg/mL. As reações pelo método de Folin-Ciocalteau foram realizadas conforme descrito acima, entretanto o volume de amostra utilizado foi de 100 µL. Por fim, os resultados para quantificação das soluções extrativas foram multiplicados por 5 para corrigir o fator de diluição em relação à curva analítica de ácido gálico. Os resultados de quantificação das soluções extrativas foram expressos como µg de equivalentes em ácido gálico por mL de solução extrativa (simplificadamente, µg/mL). Todos os valores expressos correspondem à média aritmética de três determinações.

3.2.8.5 Teor de fenólicos totais nos resíduos secos

O teor de fenólicos totais nos resíduos secos foi estimado com base no valor obtido para os fenólicos no extrato bruto. Sabendo-se a densidade do extrato bruto, a qual foi determinada com picnômetro de vidro, é possível determinar a massa de sólidos presente por mL com base no resíduo seco. Assim, calcula-se a porcentagem de compostos fenólicos em resíduo sólido como uma proporção direta entre a massa de fenólicos e a massa de sólidos totais (resíduo seco) por mL do extrato bruto. Desta forma, o cálculo do teor de fenólicos totais no resíduo seco, em equivalentes em ácido gálico, foi realizado pela seguinte equação:

$$FES (\%, m/m) = \frac{(FT \times 100)}{(\rho \times RS)} \quad (8)$$

Onde: *FES* é o teor de Fenólicos totais no resíduo seco do extrato bruto, expresso como % de equivalentes em ácido gálico, *FT* é o valor de Fenólicos Totais na solução extrativa (mg/mL), *ρ* é a densidade

da solução extrativa (mg/mL) e *RS* é o resíduo seco da solução extrativa (%).

3.2.8.6 Teor de ácido clorogênico nas soluções extrativas

O teor de ácido clorogênico nas soluções extrativas foi determinado por meio de metodologia em CLAE conforme descrito na seção 3.2.4 e 3.2.5. As amostras foram preparadas para quantificação por diluição prévia, adicionando 3 mL da solução extrativa em um balão volumétrico com capacidade para 10 mL. O volume foi completado com solução de metanol:água purificada na proporção 1:1 (v/v). As diluições foram filtradas em membrana PVDF com tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore, EUA) antes da injeção no cromatógrafo. Todas as amostras foram preparadas em triplicata para estimativa de erro na preparação. As injeções foram realizadas em duplicata para estimativa de erro do equipamento.

3.2.8.7 Teor de ácido clorogênico nos resíduos secos

De forma similar à seção 3.2.8.5, o teor de ácido clorogênico no resíduo seco também foi estimado levando em consideração dados prévios de densidade dos extratos e teor desse marcador na solução extrativa. Sendo assim, o cálculo foi realizado por meio da equação:

$$ACGES (\%, m/m) = \frac{(ACG \times 100)}{(\rho \times RS)} \quad (9)$$

Onde, *ACGES* é o teor de ácido clorogênico no resíduo seco do extrato bruto, expresso como % (m/m), *ACG* é o teor de ácido clorogênico na solução extrativa (mg/mL), *ρ* é a densidade da solução extrativa (mg/mL) e *RS* é o resíduo seco da solução extrativa (%).

3.2.8.8 Eficiência extrativa

A eficiência extrativa do processo foi avaliada para determinar a quantidade de fenólicos totais e ácido clorogênico que foram extraídos em determinadas condições de processamento. A eficiência extrativa, expressa em mg de marcador químico por g de matéria-prima vegetal, foi calculada por meio da equação:

$$Ef. Ext. (mg/g) = \frac{(C \times Rendimento)}{MPV} \quad (10)$$

Onde, C é a concentração do marcador químico avaliado, em $\mu\text{g/mL}$, *Rendimento* (em mL) refere-se ao rendimento do extrato bruto obtido após centrifugação para separação da matéria-prima vegetal e *MPV* refere-se à massa de matéria-prima vegetal (em g) empregada no processo.

3.2.8.9 Consumo energético

O consumo energético durante o processamento da matéria-prima vegetal foi registrado utilizando um wattmetro digital (Jyins, China) acoplado ao sistema de energia elétrica do equipamento extrator. O consumo em tempo real (“*online*”), em watts, foi registrado durante todos os experimentos e gráficos de consumo energético foram traçados e analisados. Como índices de consumo energético, o consumo total (em watt/hora) e o pico de consumo máximo (em watt) foram avaliados.

3.2.9 Otimização quimiométrica

Com base nos dados obtidos, procedeu-se a otimização do processo extrativo utilizando a ferramenta de otimização numérica simultânea pelo índice de desejabilidade (Equação 4). Para a otimização, utilizou-se um conjunto de objetivos e importâncias, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Relação de objetivos e importâncias na otimização do processo extrativo.

Parâmetro	Objetivo	Importância
Resíduo seco	Maximizar	3/5
Fenólicos totais no extrato bruto	Maximizar	2/5
Fenólicos no resíduo seco	Maximizar	5/5
Ácido clorogênico no extrato bruto	Maximizar	2/5
Ácido clorogênico no resíduo seco	Maximizar	5/5

3.2.10 Secagem do extrato otimizado

O extrato quimiometricamente otimizado foi produzido em maior escala visando obter extrato vegetal suficiente para a continuação dos estudos deste trabalho. O extrato foi preparado utilizando a técnica de extração por força de cisalhamento conforme descrito em 3.2.6 em

condições otimizadas. Após preparação, o álcool foi removido por evaporação rotativa à baixa pressão (MA-120, Marconi, Brasil) em banho de aquecimento a 40 °C. O concentrado resultante foi congelado por 48 h previamente à secagem.

A secagem foi realizada por criodessecação em equipamento liofilizador modelo LD1500 (Terroni, Brasil). O processamento da amostra foi realizado em câmara de vácuo com coleta de resíduo sublimado em câmara fria a -30 °C. A secagem foi finalizada após estabilização da pressão na câmara de secagem por, no mínimo, 1 h.

Após a preparação, o extrato seco obtido foi caracterizado quanto aos teores de fenólicos totais e ácido clorogênico, conforme descrito previamente nas seções 3.2.8.4 a 3.2.8.7.

3.2.11 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

Os experimentos foram realizados por meio de parceria firmada com o Laboratório de Neurobiologia da Depressão do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. Os ensaios foram realizados em colaboração com a Farmacêutica Julia Macedo Rosa e o Biólogo André Colla, sob coordenação da Prof^a Dr^a Ana Lucia Severo Rodrigues.

Todos os ensaios descritos foram avaliados em regime posológico agudo e subcrônico (6 dias) e os resultados expressos são referentes às médias obtidas entre os animais de cada grupo (n = 7). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo PP00795. As experimentações foram executadas de acordo com os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e todos os esforços possíveis foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2.11.1 Animais

Camundongos *Swiss* machos, pesando entre 45 e 55 g, com idade entre 40 e 60 dias, foram utilizados. Os animais foram mantidos, durante todo o período de crescimento, em temperatura ambiente controlada (20 – 22 °C), com livre acesso a água e alimentação, sob ciclo claro-escuro definido de 12 em 12 h (período claro: 07:00 – 19:00). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica anteriormente aos experimentos.

Com antecedência mínima de 24 h, os animais foram transferidos à sala de experimentação para ambientação. A distribuição

dos animais nos diferentes grupos foi realizada de forma randomizada, totalizando sete animais por grupo. Todos os experimentos foram realizados entre 13 e 17:00 h.

3.2.11.2 Tratamento

Para avaliação do extrato seco de *C. glaziovii* otimizado (TESO), realizou-se a suspensão deste em água destilada e polissorbato 80 (1 %; m/m). A suspensão foi submetida à irradiação ultrassônica por 10 min para facilitar a dissolução do extrato. Antes de cada administração, a suspensão foi vigorosamente agitada para garantir homogeneidade de dose. As suspensões de extrato foram administradas a quatro grupos em diferentes doses equivalentes a 0,1, 1, 10 e 50 mg/kg de extrato seco.

Como controle positivo, foi administrado bupropiona (inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina) previamente dissolvida em água destilada na dose equivalente a 10 mg/kg. Como controle negativo, administrou-se o veículo constituído somente de água destilada e polissorbato 80 (%; m/m).

Com o objetivo de verificar o efeito agudo do extrato, os testes do nado forçado e de campo aberto foram realizados 60 min após a primeira administração das doses. O efeito subcrônico do extrato foi avaliado após administração sucessiva por seis dias, seguido de avaliação comportamental após a 6ª administração. Todas as administrações foram realizadas por via oral (v.o.) fazendo uso de agulha de gavagem.

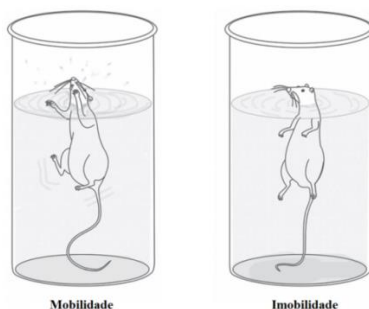
3.2.11.3 Teste do nado forçado (TNF)

Como teste preditivo para identificação de atividade tipo-antidepressiva, utilizou-se o teste do nado forçado (TNF), de acordo com o proposto por Porsolt e colaboradores (1977). A execução do ensaio foi realizada em um cilindro de plástico de (10 x 62 cm) preenchido com uma coluna de água de 19 cm de altura à temperatura ambiente (24 ± 1 °C), de tal forma que os camundongos não fossem capazes de tocar o fundo do recipiente para se apoiarem. O tempo de duração de cada sessão foi de 6 min. Entre cada sessão, o aparato foi limpo e a água trocada. As avaliações comportamentais foram gravadas e analisadas por um observador cego ao tratamento de cada grupo.

Como avaliação, registrou-se o tempo médio de imobilidade (Figura 12) durante os 4 últimos minutos do ensaio e o tempo de latência até a primeira reação de imobilidade. O tempo de imobilidade é um parâmetro importante, pois o decréscimo neste é indicativo de

atividade tipo-antidepressiva pelo aumento da reação de fuga do animal (PORSOLT et al., 1977; ABELAIRA et al., 2013). Da mesma forma, o tempo de latência aumentado indica uma maior reação do animal ao estado de imobilidade em situação de risco, comportamento típico de compostos que apresentam atividade tipo-antidepressiva (CASTAGNÉ et al., 2009).

Figura 12. Representação esquemática do teste do nado forçado, indicando os estados de mobilidade e imobilidade do camundongo. Adaptada de Abelaira e colaboradores (2013).



3.2.11.4 Teste do campo aberto (TCA)

Visando excluir a possibilidade de um efeito psicoestimulante por parte do extrato, o teste do campo aberto foi aplicado de acordo com o preconizado por Hall (1934).

Figura 13. Representação esquemática do teste do campo aberto. Adaptada de Oliveira (2014).



Brevemente, o teste foi realizado em aparato em forma de caixa medindo 40x50x60 cm, com o piso dividido em 12 quadrantes de dimensões idênticas. O número de quadrantes cruzados foi registrado

pelo tempo total de 6 min. Um cruzamento é considerado quando o animal ultrapassa o limite de um quadrante com todas as patas, conforme indicado na representação esquemática da Figura 13. O piso do aparato foi limpo com solução hidroetanólica 10 % (v/v) entre cada sessão. Todas as respostas comportamentais foram gravadas e analisadas por um observador cego ao tratamento de cada grupo.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Desenvolvimento da metodologia analítica

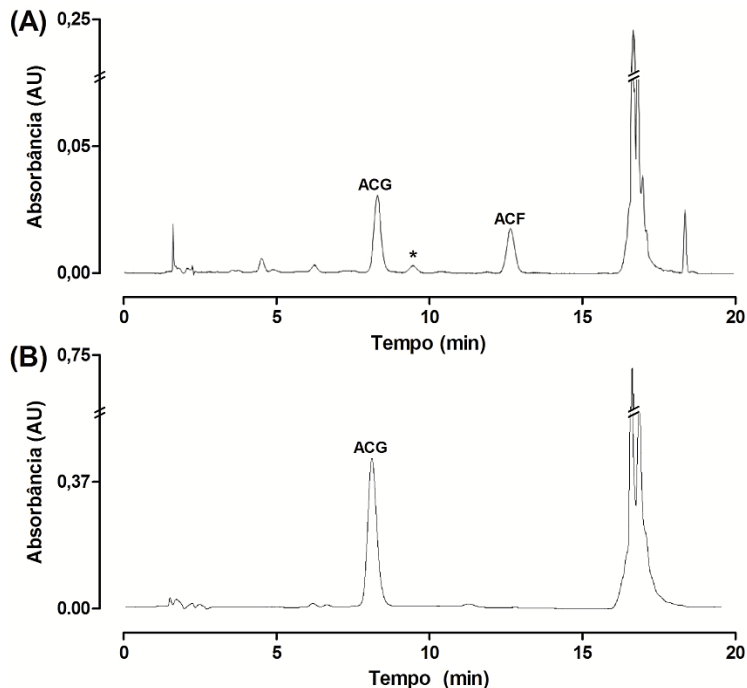
O desenvolvimento de uma metodologia analítica sensível, específica e reprodutível é essencial à pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos fitofarmacêuticos. Em se tratando de extratos vegetais, o desenvolvimento de metodologias em CLAE é especialmente desafiador, já que se busca separar inúmeras substâncias quimicamente similares de tal forma que se mantenha um tempo de análise razoavelmente reduzido e adequada resolução entre picos.

No desenvolvimento dessas metodologias, é preciso ter em mente a real aplicabilidade posterior, já que na rotina de indústrias químico-farmacêuticas o emprego de métodos cromatográficos longos se torna dispendioso e inaplicável em decorrência da alta carga de análises necessárias. Sendo assim, nesse trabalho se objetivou aprimorar um método em CLAE de tal forma que fosse possível quantificar os marcadores químicos ACG e ACF em tempo reduzido, de forma confiável e reprodutível. Partindo-se de informações prévias na literatura (AREND et al., 2011), o presente método foi desenvolvido, reduzindo sensivelmente o tempo de análise necessário.

Com aplicação da fase móvel constituída de acetonitrila e ácido trifluoracético 0,05 % (v/v) na proporção 12:88 em gradiente crescente, partindo de um *baseline* em proporção 11:89, alcança-se a eluição dos marcadores ACG e ACF em aproximadamente de 8,5 e 13 min, respectivamente. Essa condição gradiente, embora bastante branda, propiciou a separação satisfatória do pico do ACG e uma substância interferente (Figura 14) que elue concomitantemente em outras condições testadas. Após 12 min, o gradiente de limpeza foi aplicado visando eluir outras substâncias retidas na fase estacionária e, assim, permitir o término da análise cromatográfica em 20 min. A Figura 14B demonstra um cromatograma típico obtido para extratos de *C. glaziovii* nas condições descritas acima. Já o cromatograma da Figura 14A corresponde a um extrato hidroetanólico preparado por maceração, conforme descrito por Beringhs e colaboradores (2013). Ao comparar ambos os cromatogramas (Figura 14), é possível notar que os extratos

preparados por maceração apresentaram quantidades significativas de ACF, enquanto aqueles preparados por extração por força de cisalhamento apresentaram apenas traços não quantificáveis deste marcador.

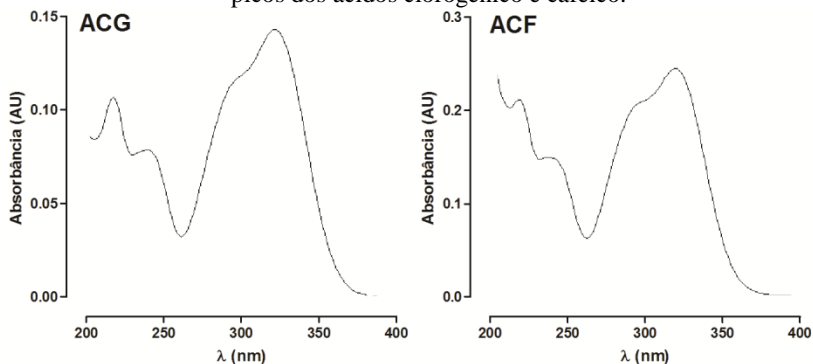
Figura 14. Cromatograma típico obtido para extratos de *C. glaziovii* preparados por (A) maceração e (B) extração por força de cisalhamento. * = substância interferente.



Os cromatogramas foram obtidos em comprimento de onda fixo de 330 nm, o qual corresponde ao ponto máximo de absorvância dos dois marcadores químicos juntos. A relativa pureza espectral dos cromatogramas foi verificada por meio de análise de arranjo de diodos dos picos de interesse, indicando a especificidade do método. Assim, foi possível notar que condições cromatográficas com resolução insatisfatória do ACG e a substância interferente levavam a alterações na pureza espectral do pico. Dentro das condições otimizadas, o espectro de arranjo de diodos para ambos os picos corresponde ao

demonstrado na Figura 15, em concordância com o verificado para os padrões analíticos desses compostos.

Figura 15. Espectros obtidos pelo detector de arranjo de diodos para os picos dos ácidos clorogênico e cafeico.



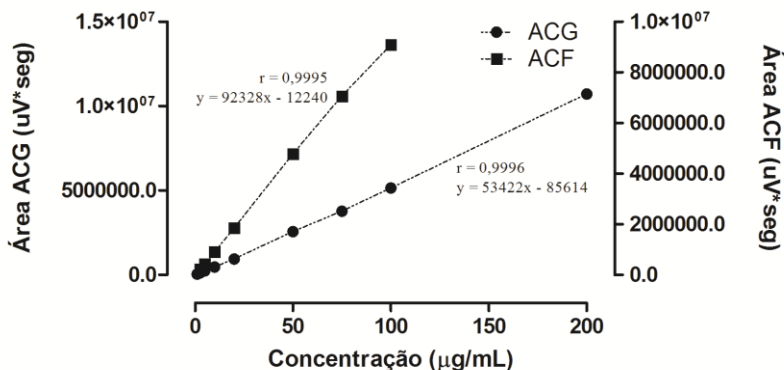
3.3.2 Validação da metodologia analítica

3.3.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da correlação entre diferentes concentrações dos marcadores químicos e as áreas de cada pico. Sendo assim, constroem-se curvas analíticas e assim se determina o coeficiente de correlação da reta (r), o qual indica a linearidade desta. Em geral, para métodos químico-analíticos, aceita-se um coeficiente maior ou igual a 0,99 (ANVISA, 2003). Para ambos os marcadores químicos, foram preparadas curvas analíticas empregando faixas de concentrações determinadas empiricamente. Como resultado, verificou-se adequada linearidade para o ACG e o ACF nas faixas de 1,0 – 200,0 e de 2,5 – 100,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em ambos os casos, verificou-se coeficientes de correlação maiores que 0,99 (Figura 16).

A partir das curvas analíticas traçadas, é possível verificar que o ACF gera uma resposta de absorbância muito mais intensa quando comparada ao ACG. Tal intensidade reflete na área de pico obtida para cada concentração e, como consequência, na inclinação da curva analítica. Por essa razão, a faixa de linearidade trabalhada para o ACF foi mais estreita em relação àquela empregada para o ACG, uma vez que a perda de linearidade pode ocorrer com o aumento da concentração desse analito.

Figura 16. Curvas analíticas obtidas para os marcadores ACG e ACF, bem como suas respectivas equações e coeficientes de correlação (r).



3.3.2.2 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites de detecção calculados para os marcadores químicos, tendo como base as curvas analíticas traçadas, refletem a concentração mínima capaz de gerar resposta de detecção, neste caso expressa em área de pico, sem a necessidade de quantificação. Dessa forma, é preconizado que o limite de detecção equivale à concentração necessária para gerar uma resposta três vezes superior ao ruído da linha de base (ANVISA, 2003). Os limites de detecção encontrados para o ACG e o ACF foram de 0,006 e 0,197 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os limites de quantificação, que determinam a concentração mínima do analito necessária para gerar resposta que permita a quantificação com precisão e exatidão, foram também determinados em função das curvas analíticas obtidas. Esses, por sua vez, representam uma concentração capaz de produzir resposta 10 vezes superior ao ruído da linha de base (ANVISA, 2003). Como valores para o LQ, obtiveram-se 0,020 e 0,598 $\mu\text{g/mL}$ para o ACG e ACF, respectivamente.

Tabela 4. Análise da precisão do método cromatográfico, determinada pela repetibilidade e precisão intermediária.

Marcador químico	Repetibilidade µg/mL (DPR%)		Precisão Intermediária µg/mL (DPR%)	
	Analista A	Analista B	Analista A	Analista B
ACG	2,42	2,45	2,48	2,52
	(1,49)	(0,38)	(1,39)	(2,11)
	51,20	50,45	49,98	50,93
	(2,48)	(1,24)	(0,12)	(1,02)
	100,03	101,51	100,25	102,33
	(0,48)	(1,34)	(0,23)	(0,30)
ACF	2,54	2,58	2,45	2,52
	(3,42)	(2,37)	(0,38)	(1,64)
	50,09	50,03	50,11	51,02
	(1,47)	(0,53)	(1,78)	(0,23)
	100,40	101,03	99,84	100,38
	(0,98)	(1,32)	(1,42)	(1,63)

3.3.2.3 Precisão

Por meio da repetibilidade, verificou-se a concordância dos valores experimentais obtidos para determinações realizadas em um curto período de tempo, por um único analista. A avaliação consistiu de três concentrações distintas, avaliadas três vezes em um único dia a cada quatro horas. A repetibilidade, conforme demonstrada na Tabela 4, indicou ótima reprodução dos resultados em um curto período de tempo, com valores muito próximos ao esperado (concentração teórica) e desvios padrão relativos inferiores a 3,5 % para todas as análises.

A precisão intermediária, por sua vez, avaliou a precisão do método quando submetido às análises em dias diferentes e com analistas diferentes. Nesse caso, a avaliação consistiu de três concentrações distintas avaliadas em três dias consecutivos por dois analistas em ordem randomizada. Como resultado, também se observou excelente precisão com valores muito próximos ao esperado (100 %) e desvios padrão relativos inferiores a 3,5 % para todas as análises (Tabela 4).

3.3.2.4 Exatidão

Os resultados obtidos nessa análise indicam forte exatidão do método para quantificação dos marcadores químicos ACG e ACF em diferentes condições. Conforme demonstrado na Tabela 5, em todos os extratos preparados, a capacidade de recuperação dos analitos permaneceu próxima a 100 %.

Tabela 5. Análise da exatidão do método cromatográfico.

Marcador químico	Teor etanólico (°GL)	Matéria-Prima Vegetal (g/100mL)	Exatidão % (DPR%)*		
			125	150	175
ACG	20	5	100.03 (0.64)	100.23 (1.09)	99.85 (0.70)
		15	100.12 (0.03)	101.39 (0.51)	100.68 (0.65)
		5	100.05 (0.02)	100.27 (0.06)	100.37 (0.15)
		15	100.01 (0.02)	101.08 (0.36)	99.82 (1.43)
	55	5	99.94 (0.14)	100.50 (0.28)	100.23 (0.06)
		15	100.02 (0.92)	100.54 (0.42)	100.60 (0.59)
		5	100.64 (0.57)	101.12 (1.13)	99.91 (1.28)
		15	99.77 (1.31)	100.46 (2.09)	100.86 (0.96)
	90	5	100.31 (0.11)	100.27 (0.09)	100.19 (0.98)
		15	99.91 (2.19)	99.85 (0.71)	99.83 (0.73)
		5	99.81 (0.67)	100.13 (1.10)	100.90 (0.64)
		15	100.17 (0.15)	101.15 (0.84)	101.12 (1.13)

*n=3

3.3.3 Estudo de triagem do processo extrativo

Antes de iniciar a padronização extrativa, a partir da matéria-prima vegetal, iniciou-se um estudo de triagem, visando à avaliação dos parâmetros que influenciam o processo de extração por força de cisalhamento desta espécie vegetal. Tal estudo se demonstrou bastante importante por não existir conhecimento prévio disponível na literatura científica no que tange os parâmetros envolvidos nesse processo.

A escolha do planejamento experimental adequado para cada objetivo é de suma importância no sucesso da estratégia experimental adotada. Nesse contexto, estabeleceu-se uma metodologia que permitisse a avaliação de diversos fatores simultaneamente, sem aumentar significativamente os custos e o tempo necessários ao experimento. Sendo assim, optou-se pela escolha de um planejamento experimental do tipo fatorial fracionado, uma vez que se trata de uma metodologia reduzida, com necessidade da execução de poucos experimentos, entretanto sem comprometimento significativo da qualidade dos dados obtidos. Dentre os planejamentos fatoriais fracionados possíveis, trabalhou-se com um planejamento 2^{4-1} , o qual

apresenta uma capacidade resolutive IV, indicando que nenhum efeito principal está relacionado com outro efeito principal ou com interações de segunda ordem. Entretanto, interações de segunda ordem podem estar relacionadas entre si (efeito *alias*). Desta forma, é importante avaliar cautelosamente as interações analisadas neste tipo de planejamento, uma vez que os resultados podem não refletir a realidade experimental. É necessário ressaltar que este planejamento apresenta qualidade de triagem somente, sendo necessária a adoção de outras metodologias experimentais para melhoramento processual, como a Metodologia de Superfície de Resposta, adotada na sequência deste estudo.

A avaliação das respostas (variáveis dependentes) do estudo de triagem, descritas no item 3.2.7.1, é apresentada a seguir.

3.3.3.1 Rendimento extrativo líquido

Os valores obtidos para a resposta de rendimento extrativo líquido em cada condição experimental se encontram descritos na Tabela 6.

Por meio da ANOVA, verificou-se a relevância estatística de cada fator, bem como suas interações, em relação à resposta. O modelo matemático desenhado para essa resposta foi estatisticamente relevante ($p < 0,0001$) e apresentou intercepto de 70,83. Dentre os fatores analisados, somente os fatores A (teor etanólico; $p < 0,0001$, coeficiente = 6,75) e B (matéria-prima vegetal; $p < 0,0001$, coeficiente = -10,75) foram estatisticamente relevantes. Assim, a equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Rendimento (mL)} = 70,83 + 6,75 * A - 10,75 * B \quad (11)$$

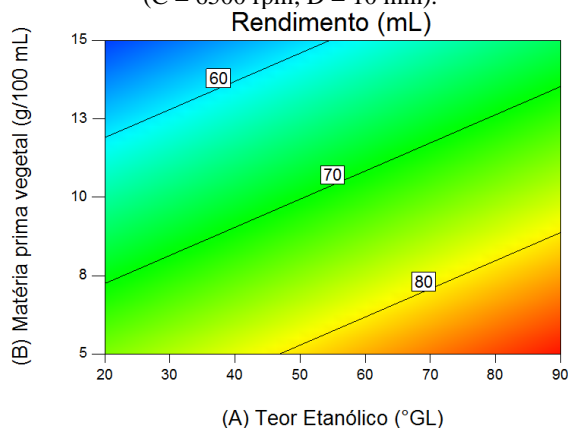
O modelo matemático não apresentou curvatura ($p = 0,0934$) e o *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9522) e R^2 ajustado (0,9416). A partir desta resposta, pode-se perceber que a quantidade de matéria-prima vegetal empregada exerce efeito bastante importante na redução do rendimento líquido do extrato à medida que a massa de folhas de *C. glaziovii* no sistema aumenta, conforme evidenciado pelo coeficiente negativo do modelo matemático. Tal efeito está associado à maior quantidade de líquido extrativo que fica retido no material vegetal, mesmo após o processo de centrifugação, gerando uma consequente perda de rendimento do extrato.

Tabela 6. Respostas obtidas para rendimento extrativo no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

#	Fatores				Rendimento (mL)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria-prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)	
1	90	5	13.500	1,0	89
2	90	15	13.500	10,0	68
3	55	10	10.000	5,5	71
4	55	10	10.000	5,5	71
5	55	10	10.000	5,5	68
6	20	15	6.500	10,0	51
7	90	5	6.500	10,0	87
8	90	15	6.500	1,0	70
9	20	15	13.500	1,0	55
10	20	5	13.500	10,0	76
11	20	5	6.500	1,0	78
12	55	10	10.000	5,5	66

Em contrapartida, à medida que se aumenta o teor etanólico do líquido extrator, aumenta-se sensivelmente o rendimento do extrato (coeficiente positivo). Assume-se aqui a possibilidade de que o etanol tenha menor afinidade pelas fibras vegetais em comparação à água, facilitando sua recuperação no processo de centrifugação e consequentemente aumentando o rendimento líquido.

Figura 17. Gráfico de contorno correlacionando o rendimento líquido, em mL, com a quantidade de matéria-prima vegetal e teor etanólico no líquido extrativo (C = 6500 rpm; D = 10 min).



Em geral, nota-se que o rendimento líquido aumenta à medida que se utiliza maior teor etanólico e menor quantidade de matéria-prima vegetal, alcançando rendimentos superiores a 80 % ao combinar teores etanólicos maiores que 60 °GL com 5 g de matéria-prima vegetal a cada 100 mL de solução extrativa. Inversamente, os menores rendimentos observados (menores que 60 %) foram encontrados ao utilizar teores etanólicos inferiores a 40 °GL e mais que 13 g de matéria-prima vegetal por 100 mL de solução extrativa.

O rendimento líquido é um fator bastante importante ao delinear um processo extrativo, uma vez que a redução no teor etanólico, embora propicie a extração de componentes mais hidrofílicos da matriz vegetal, pode reduzir sensivelmente o rendimento do processo como um todo, tornando-o muitas vezes economicamente desfavorável.

3.3.3.2 Variação de temperatura

Os valores obtidos para a variação de temperatura durante processamento do extrato, em cada condição experimental, encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Respostas obtidas para a variação de temperatura no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

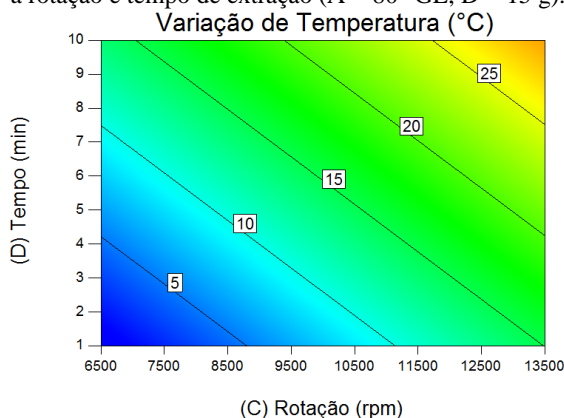
#	Fatores				Variação de Temperatura ΔT (°C)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria-prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)	
1	90	5	13.500	1,0	3
2	90	15	13.500	10,0	34
3	55	10	10.000	5,5	9
4	55	10	10.000	5,5	5
5	55	10	10.000	5,5	7
6	20	15	6.500	10,0	9
7	90	5	6.500	10,0	1
8	90	15	6.500	1,0	1
9	20	15	13.500	1,0	2
10	20	5	13.500	10,0	18
11	20	5	6.500	1,0	1
12	55	10	10.000	5,5	6

Por meio da ANOVA, verificou-se a relevância estatística de cada fator, bem como suas interações. O modelo matemático desenhado

para essa resposta foi estatisticamente relevante ($p = 0,0013$) e apresentou intercepto de 8,0. Dentre os fatores analisados, os fatores B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0135$, coeficiente = 2,88), C (rotação; $p = 0,0012$, coeficiente = 5,63) e D (tempo; $p = 0,0005$, coeficiente = 6,87) foram estatisticamente relevantes. As interações AB (efeito *alias* com interação CD) ($p = 0,0020$, coeficiente = 4,88) e AC (efeito *alias* com interação BD) ($p = 0,0102$, coeficiente = 3,13) também apresentaram relevância estatística, portanto foram incluídas no modelo matemático, embora não possam ser avaliadas individualmente por estarem relacionadas (efeito *alias*) com as interações CD e BD, respectivamente. O fator A, embora não seja relevante estatisticamente, foi mantido no modelo matemático por ser termo hierárquico das interações AB e AC. O modelo matemático não apresentou curvatura ($p = 0,1845$) e o *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9758) e R^2 ajustado (0,9466). Por fim, a equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\Delta T (^{\circ}\text{C}) = 8,0 + 1,12 * A + 2,88 * B + 5,63 * C + 6,87 * D + 4,88 * AB + 3,13 * AC \quad (12)$$

Figura 18. Gráfico de contorno correlacionando a variação de temperatura com a rotação e tempo de extração (A = 80 °GL; D = 15 g).



Notou-se, pela maior magnitude dos coeficientes dos fatores C e D, que estes influenciam de forma mais exacerbada a variação de temperatura (Figura 18). Em geral, à medida que se aumenta a rotação

do equipamento turboextrator, aumenta-se significativamente a força de cisalhamento aplicada no sistema e, como consequência, uma maior variação de temperatura ocorre por aquecimento. O tempo de extração também influencia bastante essa resposta, uma vez que extrações mais longas liberam mais energia no sistema e causam o aquecimento do mesmo. Como consequência, é possível inferir que condições extremas de tempo e rotação devem ser evitadas, especialmente se existe a possibilidade de degradação de substâncias químicas do extrato por exposição ao calor.

3.3.3.3 Resíduo seco

A partir da avaliação gravimétrica, determinaram-se os valores de resíduo seco nos extratos, os quais informam sobre o conteúdo de sólidos dissolvidos/dispersos no extrato vegetal líquido. Os valores obtidos para essa resposta se encontram descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Respostas obtidas para o resíduo seco no planejamento fatorial fracionado 2^{4+1}

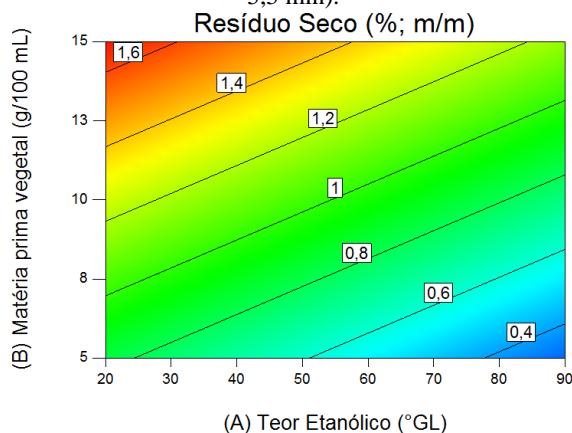
#	Fatores				Resíduo seco % (m/m)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria- prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)	
1	90	5	13.500	1,0	0,23
2	90	15	13.500	10,0	1,59
3	55	10	10.000	5,5	1,43
4	55	10	10.000	5,5	1,22
5	55	10	10.000	5,5	1,16
6	20	15	6.500	10,0	1,71
7	90	5	6.500	10,0	0,15
8	90	15	6.500	1,0	0,33
9	20	15	13.500	1,0	1,42
10	20	5	13.500	10,0	0,86
11	20	5	6.500	1,0	0,41
12	55	10	10.000	5,5	1,37

Por meio da ANOVA, verificou-se a relevância estatística de cada fator, bem como suas interações, em relação à resposta. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0024$) e apresentou intercepto de 0,99. Todos os fatores primários apresentaram relevância estatística: fatores A (teor etanólico; $p = 0,0117$, coeficiente = -0,26), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0012$, coeficiente = 0,42), C

(rotação; $p = 0,0433$, coeficiente = 0,19) e D (tempo; $p = 0,0171$, coeficiente = 0,24). Nenhuma interação de segunda ordem apresentou relevância estatística. O modelo matemático apresentou curvatura ($p = 0,0114$). O *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou adequados coeficientes de correlação R^2 (0,7702) e R^2 ajustado (0,6389). A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$RS (\%) = 0,99 - 0,26 * A + 0,42 * B + 0,19 * C + 0,24 * D \quad (13)$$

Figura 19. Gráfico de contorno correlacionando o resíduo seco com a massa de matéria-prima vegetal e teor etanólico do líquido extrator (C = 10.000 rpm; D = 5,5 min).



Conforme demonstrado na Figura 19, assim como pela maior magnitude dos coeficientes (Equação 13), os fatores A e B foram aqueles que mais influenciaram no resíduo seco. Logicamente, o aumento da quantidade de matéria-prima vegetal no sistema extrator permite a obtenção de maiores valores de resíduo seco (coeficiente positivo), uma vez que uma maior quantidade de substâncias químicas estará disponível para extração no sistema. Dentro das condições estudadas, não se alcançou um ponto de saturação de resíduo seco em relação à quantidade de matéria-prima vegetal, indicando que o emprego de massas superiores a 15 g/100 mL podem promover a obtenção de valores de resíduo seco ainda maiores. Entretanto, ressalta-se aqui a dificuldade operacional que o emprego de uma maior quantidade de matéria-prima vegetal pode causar, como, por exemplo, o aumento da

temperatura do sistema, redução de rendimento líquido e dificuldade de completa homogeneização da suspensão de matéria-prima vegetal no líquido extrator.

O teor etanólico, por sua vez, promove uma redução do teor de resíduo seco à medida que se aumenta sua concentração (coeficiente negativo). Observa-se, em alguns casos, uma redução superior a 50 % de resíduo seco, ao aumentar o teor etanólico de 20 para 90 °GL (Figura 19). Essa questão pode estar relacionada à maior seletividade que o líquido extrator adquire ao reduzir sua polaridade, uma vez que os compostos presentes neste tipo de material vegetal apresentam majoritariamente características hidrofílicas.

3.3.3.4 Fenólicos totais

Dentre as variáveis estudadas na preparação de um extrato vegetal, as mais importantes são aquelas ligadas à atividade farmacológica do mesmo, uma vez que este é o fim proposto para um produto farmacêutico. Sabe-se que, dentre os diversos compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário de plantas, vários apresentam potenciais atividades farmacológicas. Dentre os compostos com conhecida bioatividade em espécies do gênero *Cecropia*, o ACG e o ACF se destacam no que tange o potencial antidepressivo (TAKEDA et al., 2002). Portanto, o monitoramento dos teores de compostos fenólicos totais no extrato é importante como forma de identificar possíveis extratos com bioatividade aprimorada. Nesse trabalho, avaliaram-se o teores de fenólicos totais no extrato bruto e também no resíduo seco, uma vez que a forma pretendida de uso deste insumo é no estado sólido. Os valores obtidos para essas respostas se encontram descritos na Tabela 9.

A ANOVA para o teor de fenólicos totais no extrato bruto, em equivalentes de ácido gálico, revelou que todos os fatores primários avaliados apresentaram relevância estatística: A (teor etanólico; $p = 0,0387$, coeficiente = $-0,25$), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0009$, coeficiente = $0,58$), C (rotação; $p = 0,0156$, coeficiente = $0,32$) e D (tempo; $p = 0,0016$, coeficiente = $0,52$). O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0011$) e apresentou intercepto de 2,23. Nenhuma interação de segunda ordem apresentou relevância estatística. O modelo matemático apresentou curvatura ($p = 0,0001$). O *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou adequados coeficientes de correlação R^2 ($0,8733$) e R^2 ajustado ($0,7728$). A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Fenólicos Totais (mg/mL)} = 2,23 - 0,25 * A + 0,58 * B + 0,32 * C + 0,52 * D \quad (14)$$

Já no caso da ANOVA para o teor de fenólicos totais no resíduo seco, em equivalentes de ácido gálico, foi possível perceber que os seguintes termos apresentaram relevância estatística: fatores A (teor etanólico; $p = 0,0018$, coeficiente = 6,06) e C (rotação; $p = 0,0327$, coeficiente = -2,64), e interações AB/CD (efeito *alias*) ($p = 0,0410$, coeficiente = 2,44) e AC/BD (efeito *alias*) ($p = 0,0131$, coeficiente = -3,50). Os termos B e D, embora não relevantes, foram mantidos no modelo para manter a hierarquia em decorrência das interações. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0087$), com intercepto de 26,72, e curvatura significativa ($p = 0,0095$). O *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9606) e R^2 ajustado (0,9134), indicando coerência entre os valores da matriz experimental e aqueles calculados. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Fenólicos em RS (\%)} = 26,72 + 6,06 * A - 1,83 * B - 2,64 * C - 1,03 * D + 2,44 * AB - 3,50 * AC \quad (15)$$

Ao avaliar os resultados (Figura 20), é possível perceber que o teor de fenólicos totais no extrato bruto aumenta à medida que se aumenta a quantidade de matéria-prima vegetal. Tal efeito é consequência da maior disponibilidade de material vegetal para extração, levando ao aumento no teor destes compostos uma vez que o estado de saturação do meio de extração não foi alcançado ainda (não há formação de *plateau* no perfil de fenólicos totais, conforme demonstrado na Figura 20). Em contrapartida, verifica-se que o aumento na quantidade de matéria-prima vegetal causa efeito antagônico no que tange o teor de fenólicos totais no resíduo seco. Tal constatação se deve ao aumento da extração de outras substâncias não fenólicas, em decorrência do aumento na quantidade de matéria-prima vegetal no sistema extrativo. Como consequência, ao secar o extrato, ocorre diluição dos compostos fenólicos em relação ao restante dos sólidos do extrato vegetal.

Tabela 9. Respostas obtidas para o teor de fenólicos totais no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

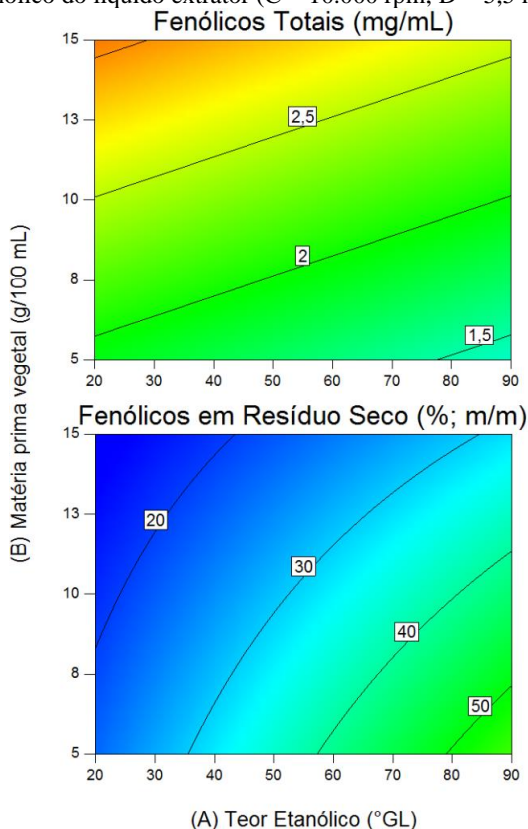
#	Fatores				Fenólicos Totais em Extrato Bruto (mg/mL)	Fenólicos em Resíduo Seco (%; m/m)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)		
1	90	5	13.500	1,0	0,54	28,3
2	90	15	13.500	10,0	3,26	24,8
3	55	10	10.000	5,5	3,22	24,6
4	55	10	10.000	5,5	3,11	27,8
5	55	10	10.000	5,5	2,97	28,3
6	20	15	6.500	10,0	2,59	15,7
7	90	5	6.500	10,0	1,06	35,9
8	90	15	6.500	1,0	1,15	41,8
9	20	15	13.500	1,0	2,32	16,9
10	20	5	13.500	10,0	2,18	25,9
11	20	5	6.500	1,0	0,94	23,7
12	55	10	10.000	5,5	3,40	26,7

Da mesma forma (Figura 20), foi possível verificar que a redução no teor etanólico promove maior extração de compostos fenólicos no estado líquido, uma vez que estes apresentam elevada hidrofiliabilidade. Como contrapartida, o reduzido teor etanólico promove também a extração em grandes quantidades de outros compostos, o que leva à diluição do teor de fenólicos totais no resíduo seco. Assim, conclui-se que o aumento gradativo no teor etanólico, embora aparentemente cause a extração de menor quantidade de fenólicos a partir da matéria-prima vegetal, promove uma extração mais seletiva, concentrando essas substâncias no estado sólido.

Em relação aos fatores C (rotação) e D (tempo), verifica-se que o aumento na rotação do equipamento extrator promove um aumento na concentração de fenólicos totais no extrato bruto, uma vez que o aumento na força de cisalhamento facilita a ruptura das células vegetais e facilita a extração dos compostos de interesse. Da mesma forma, o tempo exerce efeito positivo, maximizando o teor de fenólicos totais no extrato bruto. Em relação ao extrato no estado sólido, o aumento na rotação do equipamento se traduz na redução do teor de fenólicos, uma vez que facilita intensamente o aumento da extração de outros compostos de pouco interesse. O aumento do tempo de extração, por sua vez, promove um leve aumento no teor de fenólicos no estado sólido.

Aqui se destaca a necessidade de estudos focados no produto final que se visa obter. Nesse caso, um estudo de otimização, focando somente no teor de fenólicos totais no estado líquido acarretaria em uma condição falsamente ótima, uma vez que o extrato mais concentrado em fenólicos totais no estado sólido apresenta condições de preparação inversas àquele mais concentrado no estado líquido. Avaliando-se as informações obtidas, pode-se concluir que a obtenção de extratos concentrados em fenólicos totais no estado sólido é obtida por meio do aumento do tempo de extração e do teor etanólico concomitante à redução da rotação e da matéria-prima vegetal empregada no processo.

Figura 20. Gráfico de contorno correlacionando o teor de fenólicos totais no extrato bruto e resíduo seco, com a massa de matéria-prima vegetal e teor etanólico do líquido extrator (C = 10.000 rpm; D = 5,5 min).



3.3.3.5 Eficiência extrativa de Fenólicos Totais

Como forma de garantir um processo econômica e ecologicamente mais viável, é importante a avaliação da eficiência do processo extrativo. Os valores obtidos para essa respostas se encontram descritos na Tabela 10.

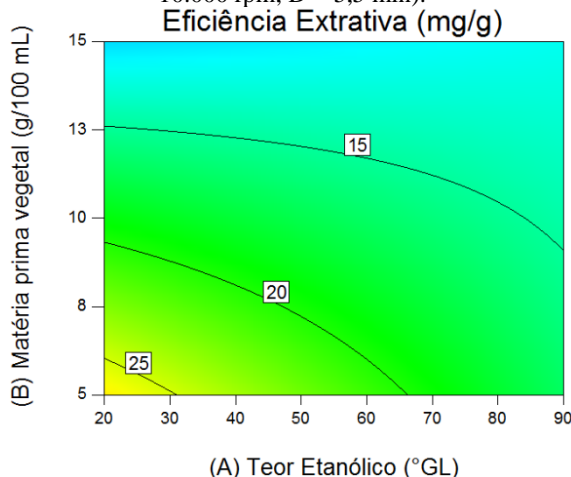
Tabela 10. Respostas obtidas para a eficiência extrativa de compostos fenólicos no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

#	Fatores				Eficiência Extrativa de Fenólicos (mg/g)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria-prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)	
1	90	5	13.500	1,0	9,54
2	90	15	13.500	10,0	14,78
3	55	10	10.000	5,5	22,89
4	55	10	10.000	5,5	22,06
5	55	10	10.000	5,5	20,23
6	20	15	6.500	10,0	8,79
7	90	5	6.500	10,0	18,53
8	90	15	6.500	1,0	5,35
9	20	15	13.500	1,0	8,51
10	20	5	13.500	10,0	33,07
11	20	5	6.500	1,0	14,67
12	55	10	10.000	5,5	22,45

A ANOVA para a eficiência extrativa de fenólicos totais mostrou que todos os fatores primários avaliados apresentaram relevância estatística: fatores A (teor etanólico; $p = 0,0017$, coeficiente = -4,21), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0021$, coeficiente = -4,03), C (rotação; $p = 0,0043$, coeficiente = 3,30) e D (tempo; $p = 0,0003$, coeficiente = 6,39). As interações AB/CD (efeito *alias*) ($p = 0,0040$, coeficiente = 3,37) e AC/BD (efeito *alias*) ($p = 0,0128$, coeficiente = -2,43) apresentaram relevância estatística. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0006$), apresentando intercepto de 23,63 e curvatura significativa ($p = 0,0002$). O *lack of fit* não foi estatisticamente significativo. O modelo matemático apresentou coeficientes de correlação R^2 (0,7657) e R^2 ajustado (0,4844). A equação matemática (Equação 16) que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$EE \text{ Fenólicos (mg/g)} = 23,63 - 4,21 * A - 4,03 * B + 3,30 * C + 6,39 * D + 3,37 * AB - 2,43 * AC \quad (16)$$

Figura 21. Gráfico de contorno correlacionando a eficiência extrativa de fenólicos totais com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal (C = 10.000 rpm; D = 5,5 min).

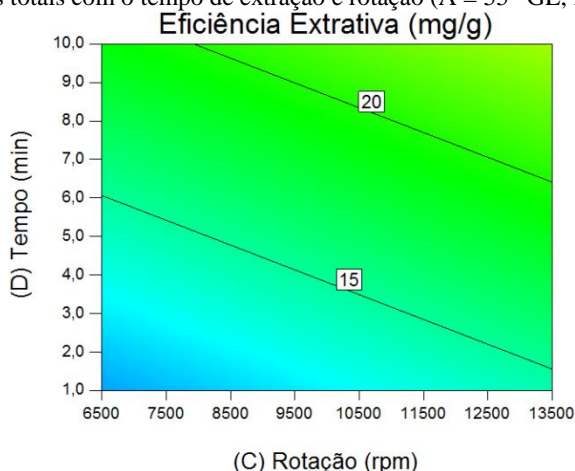


Conforme é possível verificar na Figura 21, existe uma redução gradativa na eficiência extrativa de fenólicos à medida que se aumenta a massa de matéria-prima vegetal no sistema, uma vez que o mesmo não é capaz de extrair de forma tão eficiente quando grande quantidade de material é aplicada. Na prática, é possível afirmar que a preparação de extratos com teores de matéria-prima vegetal superiores a 13 g/100 mL é bastante difícil, uma vez que a grande quantidade de sólidos dispersos no meio extrativo torna dificultosa a homogeneização. Essa dificuldade se reflete na redução da eficiência extrativa de fenólicos, uma vez que já se sabe que não ocorre a saturação do meio extrativo (conforme descrito na seção 3.3.3.4). Também foi possível notar que, conforme esperado, o aumento no teor etanólico do líquido extrativo acarreta na redução da eficiência extrativa, uma vez que os fenólicos são majoritariamente hidrofílicos e a redução na polaridade do meio dificulta sua extração.

Em relação ao tempo, é possível verificar que o aumento desse promove um aumento na eficiência extrativa, uma vez que um maior tempo de contato entre a matéria-prima vegetal e o líquido extrativo promove um incremento nos teores de fenólicos extraídos (Figura 22).

Entretanto, nota-se que, com a duplicação do tempo de extração (de 5 para 10 minutos), chega-se a um aumento de aproximadamente 33 % na eficiência extrativa, o que demonstra uma perda gradativa do poder extrativo à medida que se prolonga o tempo de extração. A eficiência extrativa também aumenta à medida que se aumenta a rotação do sistema extrator, pois facilita a quebra das células vegetais com subsequente difusão dos compostos de interesse para o meio.

Figura 22. Gráfico de contorno correlacionando a eficiência extrativa de fenólicos totais com o tempo de extração e rotação (A = 55 °GL; B = 10 g).



Em suma, foi possível notar uma correlação direta entre o teor de fenólicos totais no extrato bruto e a eficiência extrativa destes compostos, com exceção para o fator B (matéria-prima vegetal). Tal correlação é esperada, uma vez que esse é indicativo que mais fenólicos foram efetivamente extraídos. Em relação ao aumento da massa de matéria-prima vegetal, o incremento que esse promove no teor de fenólicos totais não é suficiente para superar as dificuldades operacionais associadas, refletindo em um comportamento inverso no que tange a eficiência extrativa. Dessa forma, constata-se que, por mais que o aumento na massa de matéria-prima pareça inicialmente interessante, seu aumento não promove um aumento proporcional ou manutenção da eficiência extrativa, tornando essa questão um forte aspecto contra o emprego de grandes massas de matéria-prima vegetal no processo de extração por força de cisalhamento. Soma-se a esse aspecto a vantagem econômica associada à utilização de menor

quantidade de matéria-prima vegetal. Conclui-se, portanto, que o aumento na rotação e no tempo de extração, juntamente com a redução no teor etanólico e na massa de matéria-prima vegetal empregada, promovem um aumento na eficiência extrativa.

3.3.3.6 Ácido clorogênico (ACG)

Em continuidade aos estudos visando à otimização quimiométrica de um extrato de *C. glaziovii* com atividade tipo-antidepressiva aprimorada, optou-se por avaliar dois compostos fenólicos que apresentam sabidamente atividade antidepressiva: os ácidos clorogênico (ACG) e cafeico (ACF) (TAKEDA et al., 2002).

Tabela 11. Respostas obtidas para o teor de ácido clorogênico no extrato bruto e resíduo seco no planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹

#	Fatores				ACG em Extrato Bruto (µg/mL)	ACG em Resíduo Seco (%; m/m)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria-prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)		
1	90	5	13.500	1,0	18,6	0,98
2	90	15	13.500	10,0	119,6	0,91
3	55	10	10.000	5,5	219,4	1,67
4	55	10	10.000	5,5	204,0	1,82
5	55	10	10.000	5,5	189,2	1,80
6	20	15	6.500	10,0	229,4	1,39
7	90	5	6.500	10,0	33,1	2,03
8	90	15	6.500	1,0	33,4	1,21
9	20	15	13.500	1,0	187,9	1,37
10	20	5	13.500	10,0	134,0	1,59
11	20	5	6.500	1,0	78,5	1,98
12	55	10	10.000	5,5	208,2	1,64

Conforme descrito em trabalhos prévios na literatura (AREND, 2010; AREND et al., 2011), essas substâncias aparecem como compostos majoritários de extratos macerados de *C. glaziovii*. Entretanto, somente traços do ácido cafeico foram encontrados nos turboextratos preparados pela técnica de extração por força de cisalhamento, o que vai ao encontro com a hipótese levantada por Arend e colaboradores (2011), onde as evidências indicam que o ácido cafeico encontrado em extratos de *C. glaziovii* é, na realidade, um produto de degradação do marcador químico majoritário (ACG). O ACG, por ser

um éster de ácido cafeico e de ácido quínico, pode ser hidrolisado com relativa facilidade. No caso do trabalho de Arend e colaboradores (2011), a preparação de extratos pela técnica de maceração promove condições adequadas à degradação do ACG, uma vez que envolve longos tempos de contato planta/solvente, podendo propiciar eventos de degradação química, enzimática ou microbiológica. Tais condições não ocorrem na extração por força de cisalhamento, uma vez que o processamento da amostra é bastante rápido. Desta forma, em decorrência das quantidades ínfimas desse marcador obtidas nos extratos, somente o ACG foi quantificado nesse trabalho. Todas as quantificações, conforme destacado previamente, foram realizadas por CLAE, fazendo uso do método cromatográfico previamente validado.

A ANOVA para o teor de ACG no extrato bruto revelou que os seguintes fatores apresentaram relevância estatística: A (teor etanólico; $p = 0,0002$, coeficiente = -53,01), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0014$, coeficiente = 38,4) e D (tempo; $p = 0,0136$, coeficiente = 24,59). O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0003$) e apresentou intercepto de 137,85. Nenhuma interação de segunda ordem apresentou relevância estatística. O modelo matemático apresentou curvatura ($p = 0,0001$). O *lack of fit* não foi estatisticamente relevante. O modelo matemático apresentou coeficientes de correlação R^2 (0,5627) e R^2 ajustado (0,3987). A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

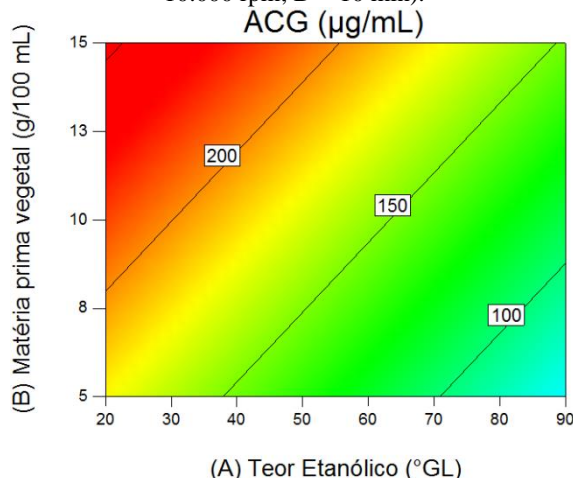
$$ACG (\mu g/mL) = 137,85 - 53,01 * A + 38,4 * B + 24,59 * D \quad (17)$$

Conforme se pode observar na Figura 23, o comportamento dessa resposta é bastante similar àquele observado para o teor de fenólicos totais no extrato bruto. Resumidamente, o aumento na massa de matéria-prima vegetal acarreta no aumento da concentração de ACG no meio extrativo, uma vez que se aumenta a quantidade dessa substância disponível para extração. Nota-se também que o teor de ACG reduz à medida que o teor etanólico do meio aumenta. O tempo de extração também é um fator importante, propiciando o aumento da extração de ACG em decorrência do maior tempo de contato planta/solvente.

A velocidade de agitação não parece apresentar efeito na extração de ACG. Dessa forma, supõe-se que a velocidade mínima empregada no processo (6500 rpm) já é suficiente para promover adequada quebra celular e, conseqüentemente, propiciar a extração do

ACG no seu nível máximo, desde que os níveis dos demais fatores estejam adequados, dentro do domínio experimental avaliado.

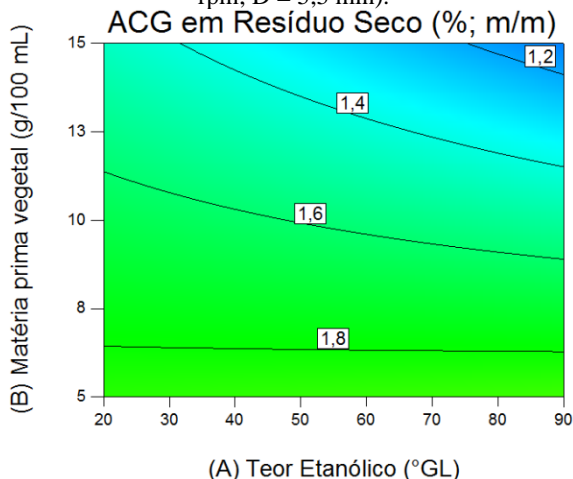
Figura 23. Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico no extrato bruto com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal (C = 10.000 rpm; D = 10 min).



Em relação à ANOVA para o teor de ACG no resíduo seco, foi possível perceber que quase todos os fatores primários e interações apresentaram relevância estatística, sendo eles: A (teor etanólico; $p = 0,0060$, coeficiente = $-0,15$), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0017$, coeficiente = $-0,21$), C (rotação; $p = 0,0015$, coeficiente = $-0,22$), e interações AC/BD (efeito *alias*) ($p = 0,0141$, coeficiente = $-0,12$) e AD/BC (efeito *alias*) ($p = 0,0077$, coeficiente = $0,14$). Embora o termo D não tenha apresentado relevância, este foi mantido no modelo em decorrência da significância das interações que o envolve. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0025$), apresentou intercepto de 1,53 e curvatura ($p = 0,0287$). O *lack of fit* não foi relevante e o modelo matemático apresentou coeficientes de correlação R^2 (0,8205) e R^2 ajustado (0,6052), indicando relativa coerência entre os valores da matriz experimental. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$ACG \text{ em RS (\%)} = 1,53 - 0,15 * A - 0,21 * B - 0,22 * C + 0,047 * D - 0,12 * AC + 0,14 * AD \quad (18)$$

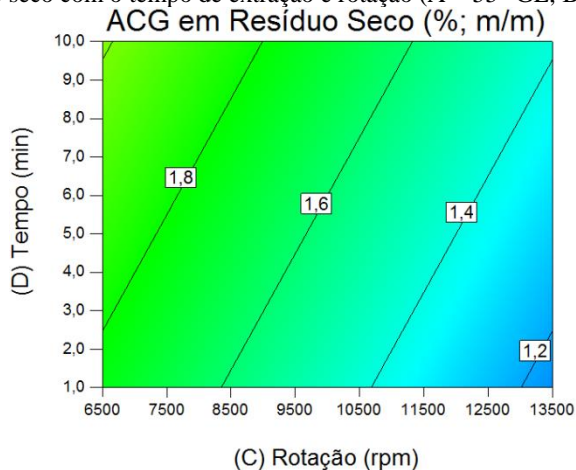
Figura 24. Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico no resíduo seco com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal ($C = 10.000$ rpm; $D = 5,5$ min).



O teor de ACG no resíduo seco mostrou comportamento semelhante ao teor de fenólicos totais no resíduo seco. Verificou-se uma correlação direta entre o aumento da massa de matéria-prima vegetal e a redução na concentração de ACG. Tal efeito ocorre pela maior disponibilidade de compostos na matriz vegetal para extração, o que acarreta na consequente diluição do marcador ACG no estado sólido (Figura 24).

Quando se avaliou o efeito do tempo e da rotação (Figura 25), foi possível perceber que o aumento do tempo promoveu uma maior concentração do ACG no resíduo seco por propiciar um maior contato planta/solvente. Já em relação à rotação do sistema, o aumento na velocidade promove a diluição do marcador por provavelmente facilitar a extração de diversos outros componentes de pouco interesse, que não são extraídos em condições mais brandas de processamento.

Figura 25. Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico no resíduo seco com o tempo de extração e rotação (A = 55 °GL; B = 10 g)



3.3.3.7 Eficiência extrativa de Ácido Clorogênico

A ANOVA para a eficiência extrativa de ACG indicou que todos os fatores primários avaliados apresentaram relevância estatística, sendo eles os fatores A (teor etanólico; $p < 0,0001$, coeficiente = -7,02), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0007$, coeficiente = -4,02), C (rotação; $p = 0,0266$, coeficiente = 1,66), D (tempo; $p = 0,0012$, coeficiente = 3,52). Além disso, a interação AB/CD (efeito *alias*) ($p = 0,0062$, coeficiente = 2,42) também apresentou relevância estatística. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0002$) e apresentou intercepto de 30,22 e o modelo matemático apresentou curvatura ($p < 0,0001$). O *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou coeficientes de correlação R^2 (0,6704) e R^2 ajustado (0,4007). A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$EE_{ACG} (\mu g/g) = 30,22 - 7,02 * A - 4,02 * B + 1,66 * C + 3,52 * D + 2,42 * AB \quad (19)$$

Tabela 12. Respostas obtidas para a eficiência extrativa de ácido clorogênico no planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹

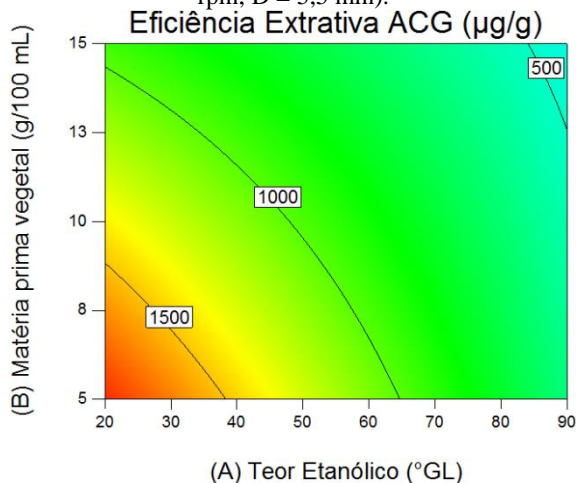
#	Fatores				Eficiência Extrativa de ACG (µg/g)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)	
1	90	5	13.500	1,0	371
2	90	15	13.500	10,0	797
3	55	10	10.000	5,5	2194
4	55	10	10.000	5,5	2040
5	55	10	10.000	5,5	1892
6	20	15	6.500	10,0	1529
7	90	5	6.500	10,0	661
8	90	15	6.500	1,0	223
9	20	15	13.500	1,0	1252
10	20	5	13.500	10,0	2660
11	20	5	6.500	1,0	1569
12	55	10	10.000	5,5	2082

Assim como observado para a eficiência extrativa de fenólicos totais, existe uma redução gradativa na eficiência extrativa de ACG à medida que se aumenta a massa de matéria-prima vegetal no sistema (Figura 26), em decorrência da redução da capacidade extrativa do sistema. Essa questão está associada ao excesso de material sólido suspenso, o qual dificulta a homogeneização adequada do sistema extrativo. O aumento do teor etanólico, por reduzir a quantidade de ACG que é efetivamente extraído da matéria-prima vegetal, acarreta na redução consequente da eficiência extrativa (Figura 26). Vale ressaltar aqui que, apesar da diminuição do teor etanólico reduzir o rendimento líquido do extrato, aquele obtido apresenta uma concentração de ACG significativamente maior quando comparado aos extratos de menor polaridade.

Além disso, também se notou que o aumento na rotação do sistema turboextrator promove um leve aumento na eficiência extrativa. Entretanto, tal aumento se apresenta bastante modesto (coeficiente de 1,66), não justificando os impactos negativos que esse aumento pode trazer, como o aumento na variação de temperatura do sistema. O tempo de extração, por sua vez, apresenta um impacto mais importante na eficiência extrativa, maximizando-a (coeficiente de 3,52). Dessa forma, é possível deduzir que a combinação de condições mais brandas de extração por maior tempo pode ser benéfica no que tange o aumento da

eficiência extrativa, sem comprometer a estabilidade do extrato preparado.

Figura 26. Gráfico de contorno correlacionando a eficiência extrativa de ácido clorogênico com o teor etanólico e massa de matéria-prima vegetal (C = 10.000 rpm; D = 5,5 min).



3.3.3.8 Consumo energético

Dentre as diversas técnicas de monitoramento de processos, de forma geral podemos as classificar como técnicas *online* ou *off-line*. Técnicas *off-line* são aquelas utilizadas para caracterizar um produto/processo após o seu término, o que, nesse caso, seriam avaliações como a determinação de teores de ácido clorogênico e fenólicos totais, por exemplo. Como técnicas *online*, existem diversas que são empregadas em áreas da indústria como o controle em tempo real de consumo de energia (HANSULD; BRIENS, 2014). Apesar da grande praticidade que essas técnicas oferecem, por permitirem o controle do processo em tempo real, elas ainda não são empregadas na preparação e padronização de extratos vegetais.

Em decorrência do exposto, nessa etapa foi explorada a possibilidade do monitoramento, em tempo real, do consumo de energia do equipamento extrator, como forma de controle do processo. Trabalhou-se com a hipótese de que as partículas da matéria-prima vegetal geram resistência mecânica, aumentando a força necessária para que o sistema rotor-estator mantenha seu pleno funcionamento. As partículas da matéria-prima vegetal, à medida que o processo avança,

são trituradas até alcançarem granulometria bastante reduzida, similar ao espaçamento entre o rotor e estator da haste do equipamento turboextrator. Dessa forma, espera-se observar alterações no perfil de consumo do equipamento à medida que o processo evolui.

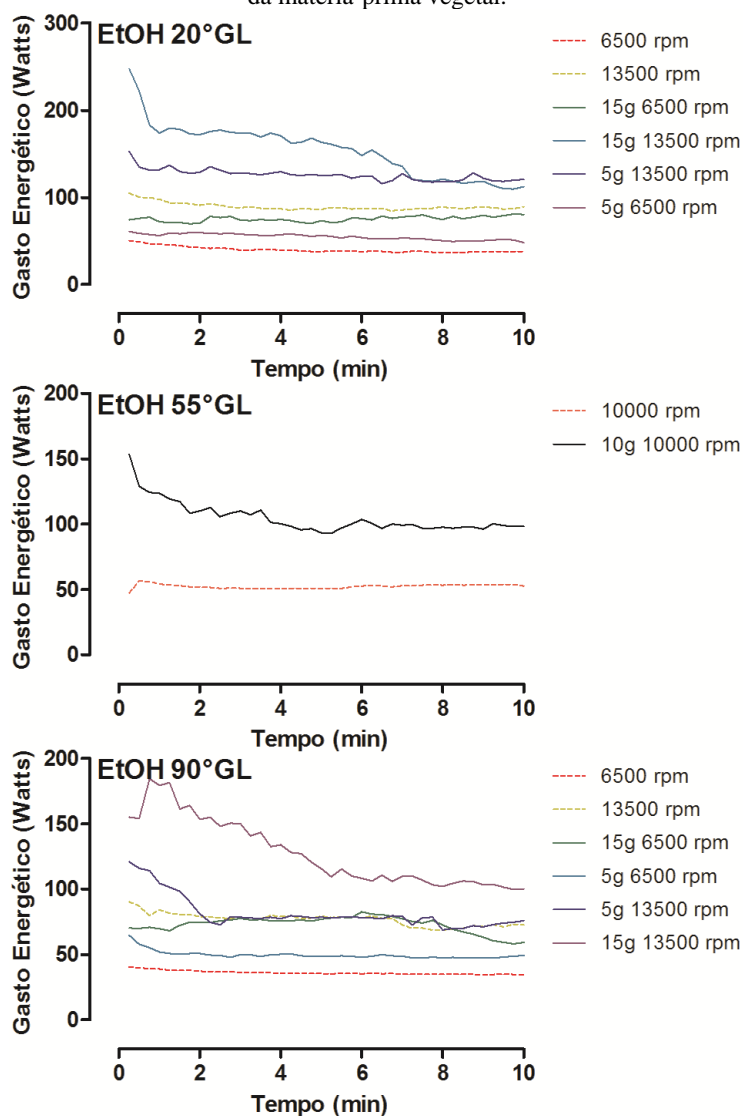
Sendo assim, para todas as condições experimentais, foram registrados gráficos de consumo de energia e os índices de consumo energético de cada experimento: consumo total (em watt/hora) e o pico de consumo máximo (em watt).

Em relação aos gráficos de consumo de energia em tempo real (Figura 27), é possível verificar que, em todas as condições, ocorre uma tendência ao maior consumo de energia nos primeiros minutos de extração, seguida por uma redução até alcançar relativa estabilização do consumo. Esse comportamento é um reflexo claro do que acontece no sistema extrator durante esse período de tempo, iniciando com a trituração da matéria-prima vegetal até o ponto em que o tamanho de partícula não é mais reduzido. Essa redução no tamanho de partícula está associada à redução da energia gasta no sistema extrator, uma vez que as partículas menores fluem mais facilmente pelo sistema rotor-estator, gerando menos resistência mecânica.

Com base nos comportamentos demonstrados para todas as condições experimentais, independente da velocidade, é possível verificar que o aumento na massa de matéria-prima vegetal empregada gera um prolongamento no período inicial de maior consumo energético. Tal fato está relacionado à maior quantidade de matéria-prima vegetal que necessita ser processada. Também se verifica uma maior intensidade de consumo energético, expressa por picos de consumo mais elevados, em decorrência da maior concentração de partículas dispersas no mesmo volume de líquido extrator.

Em geral, o monitoramento em tempo real do consumo energético forneceu informações bastante importantes. Verificou-se que, para todas as condições, o emprego de tempos curtos de processamento, como 1 min, são inviáveis, uma vez que não há tempo hábil para a redução adequada do tamanho de partícula da matéria-prima vegetal. Caso condições como essa sejam empregadas, o princípio da técnica se perde e o método passa a ser semelhante à maceração, uma vez que não ocorre a redução do tamanho de partícula da matéria-prima vegetal com rompimento celular, mediado pela força de cisalhamento.

Figura 27. Gráficos de consumo energético em tempo real. Linhas pontilhadas indicam o perfil de consumo energético somente do meio extrativo, sem adição da matéria-prima vegetal.



Foi possível concluir também que condições extremas que envolvem alta concentração de matéria-prima vegetal e alta velocidade

de rotação não são adequadas, uma vez que promovem um gasto energético muito elevado. Tal gasto energético, resultante do aumento da resistência mecânica no sistema, promove a conversão da energia cinética em calor (KAVIANY, 2008). O calor produzido no sistema se dissipa através do meio líquido, aumentando a variação de temperatura de processamento dos extratos vegetais, conforme descrito previamente. Verificou-se que o emprego de menores massas de matéria-prima vegetal (neste caso, 5 g) é interessante, por permitir ótimas condições de homogeneização no sistema, o que reflete na rápida estabilização dos perfis energéticos.

A partir dos perfis energéticos obtidos para cada condição experimental, foram extraídos dados como o consumo total durante o processamento (em watt/hora) e o pico de consumo máximo (em watt) (Tabela 13) e estas informações foram analisadas por ANOVA.

Em relação ao consumo total (Tabela 13), verificou-se que os fatores A (teor etanólico; $p = 0,0382$, coeficiente = -0,63), B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0113$, coeficiente = 0,87), C (rotação; $p < 0,0001$, coeficiente = 2,88) e D (tempo; $p < 0,0001$, coeficiente = 6,38) e a interação AB/CD (efeito *alias*) ($p < 0,0001$, coeficiente = 2,63) apresentaram relevância estatística. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0001$), apresentando intercepto de 9,67 e significância na curvatura ($p < 0,0085$). O *lack of fit* não foi relevante e o modelo apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9805) e R^2 ajustado (0,9643). A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Consumo total (W/h)} = 9,67 - 0,63 * A + 0,87 * B + 2,88 * C + 6,38 * D + 2,63 * AB \quad (20)$$

Em geral, o consumo total de energia durante o processamento reduz à medida que se aumenta o teor etanólico do líquido extrativo (coeficiente negativo). O etanol é um solvente de menor viscosidade quando comparado à água, logo, o aumento no seu teor no sistema hidroetanólico promove a redução da viscosidade do meio e, consequentemente, reduz a energia necessária para manter o sistema em funcionamento, por promover menor resistência mecânica ao movimento do sistema rotor-estator. Verifica-se um aumento no consumo total de processamento à medida que se eleva a massa de matéria-prima vegetal empregada (coeficiente positivo), uma vez que o elevado número de partículas sólidas em suspensão reflete na

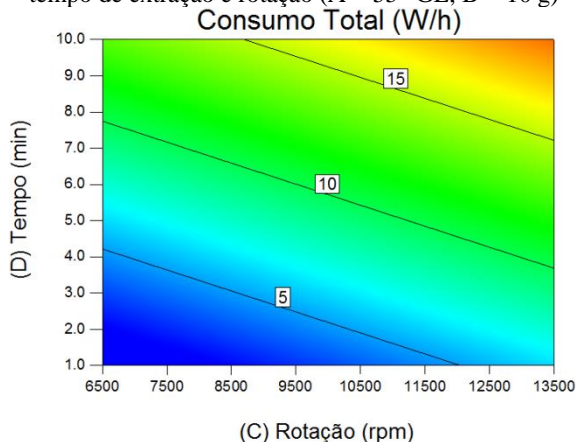
necessidade de maior gasto energético para homogeneização, pela resistência mecânica ao movimento. Apesar de os fatores A e B serem sumariamente importantes nessa questão, a magnitude de suas influências é mais baixa quando comparadas aos fatores C (rotação) e D (tempo), que são aqueles que mais interferem no consumo energético total do processo extrativo.

Tabela 13. Respostas obtidas para os índices de consumo energético no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

#	Fatores				Consumo total (W/h)	Pico de consumo máximo (watt)
	(A) Teor Etanólico (°GL)	(B) Matéria prima vegetal (g/100mL)	(C) Rotação (rpm)	(D) Tempo (min)		
1	90	5	13.500	1,0	2	116,6
2	90	15	13.500	10,0	21	192,4
3	55	10	10.000	5,5	11	153,2
4	55	10	10.000	5,5	11	160,9
5	55	10	10.000	5,5	10	155,5
6	20	15	6.500	10,0	12	84,7
7	90	5	6.500	10,0	8	68,4
8	90	15	6.500	1,0	3	86,3
9	20	15	13.500	1,0	4	255,0
10	20	5	13.500	10,0	21	163,7
11	20	5	6.500	1,0	2	66,1
12	55	10	10.000	5,5	11	157,8

Verificou-se desta forma que o aumento da rotação promove um aumento bastante importante no gasto energético (coeficiente positivo), sendo esse o parâmetro que mais influencia na energia necessária para o funcionamento do sistema (Figura 28). Da mesma forma, o tempo de extração é igualmente importante, uma vez que, quanto mais tempo o equipamento permanece funcionando, maior será o gasto de energia total (Figura 28).

Figura 28. Gráfico de contorno correlacionando o gasto energético total com o tempo de extração e rotação (A = 55 °GL; B = 10 g)



Ao avaliar o pico de consumo máximo (em watts) durante o processo, verificou-se que os fatores B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0322$, coeficiente = 25,45) e C (rotação; $p = 0,0005$, coeficiente = 52,77) apresentaram relevância estatística. O modelo matemático desenhado foi estatisticamente relevante ($p = 0,0007$), com intercepto de 138,38, não apresentando significância na curvatura e no *lack of fit*. O modelo apresentou adequados coeficientes de correlação R^2 (0,7904) e R^2 ajustado (0,7438), sendo que a equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

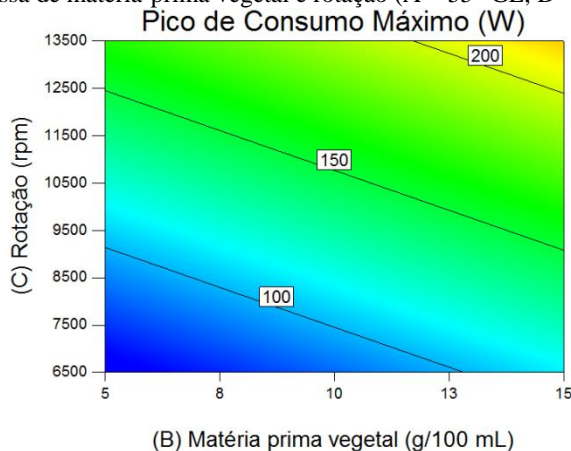
$$\text{Pico de consumo máximo (W)} = 138,38 + 25,45 * B + 52,77 * C \quad (21)$$

Desta forma, verificou-se que o pico de consumo máximo, caracterizado como o ponto de maior consumo durante o processamento, ocorre sempre no primeiro minuto de análise, como consequência, o fator D (tempo) não apresentou relevância estatística ($p < 0,05$). O fator A (teor etanólico), embora tenha impacto no consumo total do processo extrativo, não impacta diretamente o pico de consumo máximo. Entretanto, como se sabe que a redução do teor etanólico causa uma maior resistência mecânica ao movimento e, portanto, aumenta o gasto energético do sistema, é possível especular que esse fator não apresenta relevância somente em decorrência da alta magnitude dos coeficientes dos fatores B (matéria-prima vegetal) e C (rotação). Uma

vez que esses fatores influenciam enormemente o pico de consumo máximo, pequenas influências como a do teor etanólico podem ser descartadas.

Como resultado, verificou-se que os aumentos na rotação e na massa de matéria-prima vegetal empregada geram um aumento na magnitude do pico de consumo máximo (Figura 29). Tais resultados são um reflexo direto da maior resistência mecânica que o sistema apresenta ao aumentar a massa de partículas vegetais suspensas.

Figura 29. Gráfico de contorno correlacionando o pico de consumo máximo com massa de matéria-prima vegetal e rotação (A = 55 °GL; D = 5,5 min)



3.3.4 Estudo de otimização do processo extrativo

Um dos maiores desafios ao empregar metodologias quimiométricas para otimização de produtos e processos é conhecer exatamente qual é o domínio experimental de interesse (MYERS et al., 2009). Uma metodologia de otimização bem empregada parte de extensivas informações prévias no que tange o comportamento do processo nas condições avaliadas. Uma das formas de se obter essas informações parte de dados previamente publicados na literatura, os quais são de grande valia para o emprego destas metodologias. No caso do processo de extração por força de cisalhamento, a falta de publicações sobre este tema gerou um problema técnico na otimização do processo, uma vez que pouco se sabe em relação ao desempenho da técnica, especialmente no campo experimental de estudo. Por essa razão, optou-se pela realização de experimentos prévios, por meio do emprego de um delineamento experimental de triagem (Fatorial 2^{4-1}),

com vistas à obtenção do máximo de informações possível com um número significativamente reduzido de experimentos.

Conforme descrito extensivamente na seção 3.3.3, a partir de um total de 12 extrações de folhas de *C. glaziovii*, foi possível obter informações sobre o comportamento do processo, dentro de um domínio experimental amplo. Avaliaram-se concentrações etanólicas na faixa de 20 a 90 °GL, extremos de rotações do sistema extrator (6500 a 13500 rpm) e diferentes massas de matéria-prima vegetal (5 a 15 g) e tempos de extração (1 a 10 min). O propósito de um planejamento experimental do tipo fatorial fracionado é, justamente, prover conhecimento a respeito do que acontece em uma ampla extensão de condições experimentais. Nesse tipo de metodologia, não se procura por uma condição extrativa ótima, mas sim se busca descrever o processo com o intuito de prover informações para futuros processos de otimização. Dessa forma, foi possível descrever o comportamento, mesmo que superficialmente, de diversas condições em função dos fatores A, B, C e D, previamente estudados.

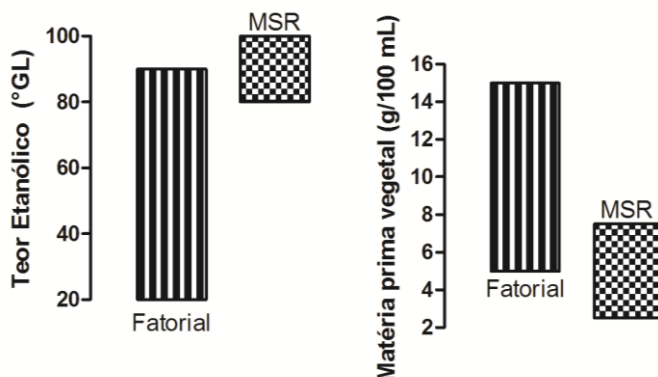
Por fim, deve-se ter em mente quais são os objetivos a serem traçados a partir das informações oriundas do planejamento fatorial de triagem. O objetivo, nesse trabalho, é a obtenção de um extrato seco altamente concentrado em fenólicos totais e ácido clorogênico. Logo, as condições experimentais devem ser voltadas para esse objetivo. Verificou-se que as condições que extraem maiores concentrações dos compostos de interesse são aquelas que diluem os mesmos ao secar o extrato, justamente por propiciar a extração de diversas outras substâncias de pouco interesse terapêutico. Em decorrência disso, a eficiência extrativa do processo deve ser maximizada de forma racional, procurando promover concentrações máximas de substâncias ativas no produto final. Dessa forma, partindo-se das informações obtidas previamente, optou-se por padronizar o tempo de extração em 10 min, uma vez que esta condição se mostrou benéfica para a concentração dos componentes de interesse no estado sólido. Além disso, optou-se por trabalhar somente com a menor rotação (6500 rpm), para minimizar a extração excessiva de compostos minoritários e reduzir a temperatura do sistema, reduzindo assim a dissipação da energia cinética na forma de calor.

Os fatores A (teor etanólico) e B (massa de matéria-prima vegetal), em diversas situações, se mostraram os mais importantes no que tange o processo extrativo. Dessa forma, optou-se por estudar mais profundamente estes fatores, extrapolando os limites do domínio experimental estudado previamente, para assim alcançar uma condição

extrativa ótima. O teor etanólico foi explorado nas bordas do seu limite superior por essas condições propiciarem uma extração mais seletiva dos marcadores químicos, promovendo a concentração destes no estado sólido. A matéria-prima vegetal foi explorada nas bordas do seu limite inferior por serem essas as condições mais adequadas para promover a extração racional dos marcadores químicos, sem gastos excessivos de matéria-prima vegetal.

Conforme demonstrado na Figura 30, o planejamento de otimização a ser empregado, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, tem como objetivo o estudo aprofundado de regiões sobrepostas e extrapoladas em relação ao planejamento fatorial previamente aplicado.

Figura 30. Sobreposição e extrapolação de domínios experimentais entre os planejamentos fatorial e de superfície de resposta (rotação = 6500 rpm; tempo = 10 min).



Sendo assim, o delineamento experimental empregado foi um planejamento do tipo Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), com processamento em algoritmo *IV-Optimal*, o qual visa à redução na variação preditiva do modelo matemático dentro do domínio experimental (MYERS et al., 2009; JONES; GOOS, 2012). O delineamento consistiu de 13 experimentos, variando os fatores A (teor etanólico; 80 – 100 °GL) e B (matéria-prima vegetal; 2,5 – 7,5 g/100 mL). Levando em consideração o caráter deste delineamento, somente foram avaliadas aquelas respostas de grande importância no processo de otimização visando obter um produto bioativo. As respostas retidas foram: resíduo seco, variação de temperatura e teores de fenólicos totais e ácido clorogênico tanto no extrato bruto quanto no seco.

3.3.4.1 Variação de temperatura e resíduo seco

As respostas obtidas para a variação de temperatura e resíduo seco, nas diversas condições experimentais avaliadas, encontram-se descritas na Tabela 14.

Tabela 14. Respostas obtidas para a variação de temperatura e resíduo seco no planejamento MSR IV-*Optimal*.

#	Fatores		Variação de temperatura (°C)	Resíduo seco (%; m/m)
	Teor Etanólico (°GL)	Matéria-prima vegetal (g/100 mL)		
1	80,0	4,17	2	0,41
2	80,0	7,5	1	0,77
3	100,0	7,5	1	0,25
4	86,7	2,5	2	0,19
5	90,0	7,5	2	0,53
6	90,0	5,0	2	0,34
7	80,0	4,17	2	0,42
8	95,0	6,25	1	0,38
9	90,0	5,0	1	0,35
10	86,7	2,5	2	0,18
11	100,0	5,0	1	0,16
12	100,0	2,5	1	0,05
13	90,0	5,0	2	0,35

Conforme é possível perceber claramente, a variação de temperatura, para todas as condições experimentais, permaneceu entre 1 a 2 °C, indicando que as condições trabalhadas não promovem o acúmulo de energia excessivo no sistema. Ao analisar esta resposta por ANOVA, percebe-se que o modelo matemático não apresenta relevância estatística ($p = 0,0704$), o que reflete o fato de que nenhum dos fatores avaliados nesse estágio implicam no aumento da temperatura do sistema. Em suma, todas as condições experimentais parecem ser compatíveis no que tange à preparação de extratos, de forma que garanta a estabilidade de possíveis compostos termolábeis.

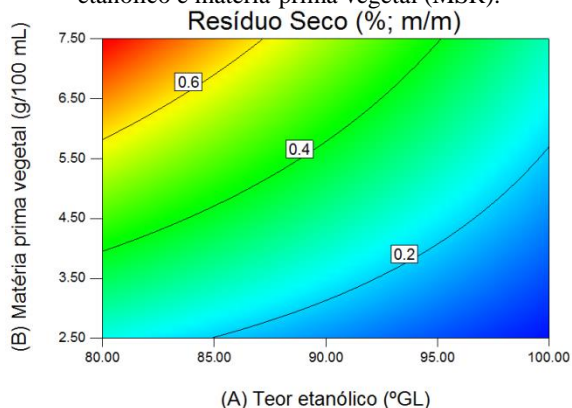
Em relação ao resíduo seco, é possível notar que as condições avaliadas geraram baixas concentrações em resíduo seco (valores inferiores a 1 %). Conforme se verificou previamente, teores etanólicos elevados (acima de 80 °GL) promovem uma extração mais seletiva de componentes e, por sua vez, reduzidos teores em resíduo seco nos

extratos. Ao avaliar a ANOVA, nota-se que tanto os fatores A (teor etanólico; $p < 0,0001$, coeficiente = -0,17) e B (matéria-prima vegetal; $p < 0,0001$, coeficiente = 0,19), quanto a sua interação AB ($p < 0,0001$, coeficiente = -0,079) apresentam relevância estatística. Nesse caso, como as interações primárias não estão relacionadas entre si, é possível afirmar que a interação AB efetivamente acontece, o que se traduz em um comportamento dependente dos dois fatores. O modelo matemático desenhado para essa resposta apresentou relevância estatística ($p < 0,0001$) e o intercepto foi de 0,34. O *lack of fit* não foi relevante. Por fim, a equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Resíduo seco (\%)} = 0,34 - 0,17 * A + 0,19 * B - 0,079 * AB \quad (22)$$

O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9900), R^2 ajustado (0,9867) e R^2 preditivo (0,9702), validando o modelo como ferramenta preditiva para otimização.

Figura 31. Gráfico de contorno correlacionando o resíduo seco com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR).



Conforme pode ser verificado na Figura 31, o aumento na matéria-prima vegetal empregada gera um consequente aumento no resíduo seco, uma vez que existe uma maior quantidade de compostos disponíveis à extração. De forma inversa, o aumento no teor etanólico do líquido extrativo promove a redução do resíduo seco, pela redução de polaridade, a qual promove uma extração mais seletiva de compostos.

Tais comportamentos vão de encontro ao verificado no planejamento fatorial de triagem realizado previamente.

3.3.4.2 Fenólicos totais

Em relação aos fenólicos totais, tanto no extrato bruto quanto no resíduo seco, os valores encontrados estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Respostas obtidas para o teor de fenólicos totais no planejamento MSR IV-*Optimal*.

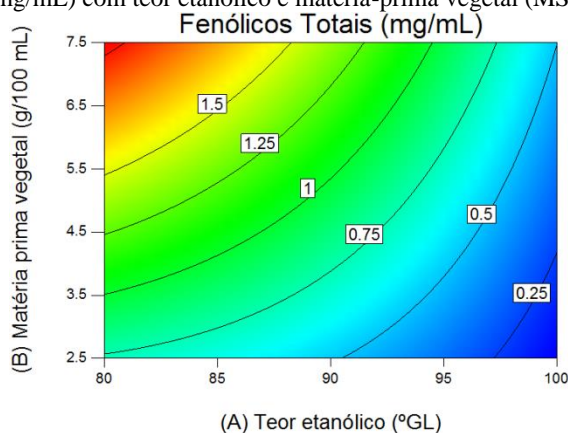
#	Fatores		Fenólicos Totais em Extrato Bruto (mg/mL)	Fenólicos em Resíduo Seco (%; m/m)
	Teor Etanólico (°GL)	Matéria-prima vegetal (g/100 mL)		
1	80,0	4,17	1,15	33,0
2	80,0	7,5	2,04	31,3
3	100,0	7,5	0,47	24,1
4	86,7	2,5	0,62	39,8
5	90,0	7,5	1,39	32,2
6	90,0	5,0	0,94	33,8
7	80,0	4,17	1,22	34,3
8	95,0	6,25	0,87	28,3
9	90,0	5,0	0,92	32,1
10	86,7	2,5	0,59	39,4
11	100,0	5,0	0,31	25,3
12	100,0	2,5	0,13	34,6
13	90,0	5,0	0,89	31,0

O teor de fenólicos totais, no extrato bruto, variou na faixa de 0,13 a 2,04 mg/mL em equivalentes de ácido gálico, concentrações esperadas para as condições experimentais, levando em consideração os dados prévios obtidos no delineamento fatorial de triagem. Ao avaliar a resposta por ANOVA, verificou-se que ambos os termos A (teor etanólico; $p < 0,0001$, coeficiente = -0,54) e B (matéria-prima vegetal; $p < 0,0001$, coeficiente = 0,43), assim como sua interação AB ($p < 0,0001$, coeficiente = -0,24), apresentaram relevância estatística. Destaca-se aqui o fato do termo quadrático para o teor etanólico (A^2 ; $p = 0,0062$, coeficiente = -0,088) também apresentar relevância estatística. Essa questão é indicativa de que a resposta em função do fator A apresenta um comportamento não proporcional dentro do domínio experimental, caracterizada pela formação de *plateau* (MYERS et al., 2009). Esse comportamento é desejável em processos de otimização, uma vez que

indica o encontro de condições de estabilização da resposta, o que, em muitos casos, é o ponto ótimo. Verificou-se também que o modelo matemático desenhado para essa resposta apresentou relevância estatística ($p < 0,0001$) e o intercepto do modelo foi 0,94. O *lack of fit* não foi estatisticamente relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9958), R^2 ajustado (0,9937) e R^2 preditivo (0,9874), validando o modelo como ferramenta preditiva para otimização. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Fenólicos totais (mg/mL)} = 0,94 - 0,54 * A + 0,43 * B - 0,24 * AB - 0,088 * A^2 \quad (23)$$

Figura 32. Gráfico de contorno correlacionando o teor de fenólicos totais (mg/mL) com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR).



Ao avaliar o gráfico de contorno para essa resposta (Figura 32), é possível verificar claramente que o aumento no teor etanólico reduz a concentração total de fenólicos no extrato bruto. Da mesma forma, a redução na massa de matéria-prima vegetal empregada também reduz a concentração deste grupo químico. As linhas do gráfico de contorno apresentam uma leve curvatura, comportamento característico de interações entre fatores, como vemos neste caso. O coeficiente negativo desta interação indica que, à medida que se aumenta o teor etanólico, reduz-se a capacidade do aumento da massa de matéria-prima vegetal em aumentar o teor de fenólicos totais no extrato bruto, e vice-versa.

Também é possível notar um aumento na distância entre as linhas de contorno na porção do gráfico acima de 5,5 g/100 mL de matéria-prima vegetal em teor etanólico inferior a 90 °GL. Esse comportamento é decorrente do termo quadrático A^2 e caracteriza a formação de um *plateau* pela perda de efeito do fator na resposta. Entretanto, o coeficiente para o termo A^2 é bastante inferior aos coeficientes dos outros termos, o que reflete em uma alteração de comportamento bastante pequena.

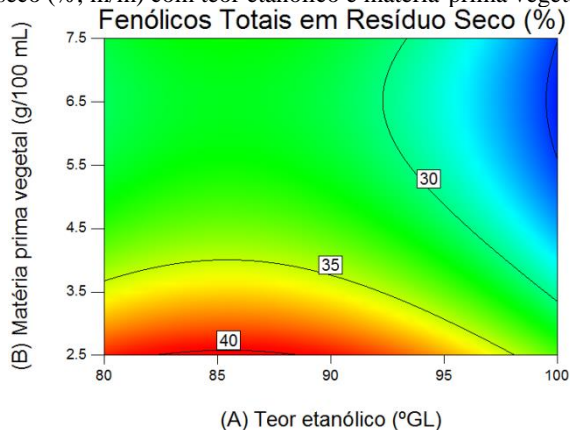
Em relação ao teor de fenólicos totais em resíduo seco, em equivalentes de ácido gálico, é possível perceber que os resultados obtidos variaram na faixa de 24,1 a 39,8 % (m/m), o que indica que todos os extratos preparados nesse estágio apresentaram teores de fenólicos totais na massa seca relativamente elevados.

Ao avaliar os resultados por ANOVA, percebe-se que tanto o fator A (teor etanólico; $p < 0,0001$, coeficiente = -3,03) quanto o B (matéria-prima vegetal; $p = 0,0001$, coeficiente = -4,13) são estatisticamente relevantes, sendo que ambos os termos quadráticos A^2 ($p = 0,0009$, coeficiente = -3,31) e B^2 ($p = 0,0008$, coeficiente = 3,38) apresentaram relevância, caracterizando a formação de *plateau* na resposta. O modelo matemático que rege essa resposta apresentou relevância estatística ($p < 0,0001$) e o intercepto foi 32,13. O *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9630), R^2 ajustado (0,9445) e R^2 preditivo (0,8909), validando o modelo como ferramenta preditiva para otimização. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$\text{Fenólicos em RS (\%)} = 32,13 - 3,03 * A - 4,13 * B - 3,31 * A^2 + 3,38 * B^2 \quad (24)$$

Conforme demonstrado na Figura 33, foi possível notar o alcance de uma região ótima para concentração dos fenólicos totais no resíduo seco do extrato vegetal. Verificou-se que a utilização de álcool etílico puro e maiores massas da matéria-prima no processo extrativo não é interessante, por apresentar os menores valores de fenólicos totais em resíduo seco. Tais resultados indicam a necessidade de focar o estudo de otimização na preparação de extratos com teores etanólicos na faixa de 80 a 90 °GL e matéria-prima vegetal em proporções inferiores a 5 g/100 mL de líquido extrativo.

Figura 33. Gráfico de contorno correlacionando o teor de fenólicos totais em resíduo seco (%; m/m) com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR).



3.3.4.3 Ácido clorogênico

O teor de ACG tanto no extrato bruto quanto no resíduo seco foi quantificado para todas as condições avaliadas uma vez que é possível que este marcador químico tenha importante função na manutenção da atividade biológica tipo-antidepressiva de extratos de *C. glaziovii*. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 16.

O teor de ácido clorogênico no extrato bruto variou na faixa de 12,6 a 99,9 µg/mL, as quais são concentrações significativamente inferiores àquelas obtidas no planejamento fatorial de triagem. Entretanto, tal efeito era esperado uma vez que esse delineamento de otimização foi desenhado buscando a maximização dos teores em resíduo seco, os quais são obtidos em condições inversas àquelas que maximizam o teor no extrato bruto. Ao avaliar a resposta por ANOVA, verificou-se que ambos os termos A (teor etanólico; $p < 0,0001$, coeficiente = -23,81) e B (matéria-prima vegetal; $p < 0,0001$, coeficiente = 15,44), assim como sua interação AB ($p = 0,0396$, coeficiente = -14,43), apresentaram relevância estatística. Verificou-se também que o modelo matemático desenhado para esta resposta apresentou relevância estatística ($p < 0,0001$) e o intercepto foi 37,91. O *lack of fit* não foi estatisticamente relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9815), R^2 ajustado (0,9754) e R^2 preditivo (0,9258), validando o modelo como ferramenta preditiva para otimização. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$ACG (\mu g/mL) = 37,91 - 23,81 * A + 15,44 * B - 14,43 * AB \quad (25)$$

Tabela 16. Respostas obtidas para o teor de ácido clorogênico no planejamento MSR IV-Optimal.

#	Fatores		ACG em Extrato Bruto ($\mu g/mL$)	ACG em Resíduo Seco (%; m/m)
	Teor Etanólico ($^{\circ}GL$)	Matéria-prima vegetal (g/100 mL)		
1	80,0	4,17	52,8	1,52
2	80,0	7,5	99,9	1,60
3	100,0	7,5	20,7	1,06
4	86,7	2,5	27,7	1,77
5	90,0	7,5	43,2	1,01
6	90,0	5,0	32,5	1,18
7	80,0	4,17	53,1	1,49
8	95,0	6,25	30,5	0,98
9	90,0	5,0	32,0	1,11
10	86,7	2,5	27,2	1,83
11	100,0	5,0	20,8	1,68
12	100,0	2,5	12,6	3,23
13	90,0	5,0	32,7	1,14

É possível verificar que ocorre uma redução no teor de ACG no extrato bruto à medida que se aumenta o teor etanólico e reduz-se a massa de matéria-prima vegetal (Figura 34). O comportamento aqui verificado é similar àquele dos fenólicos totais no extrato bruto, indicando que condições extrativas semelhantes para ambas as respostas promovem resultados similares.

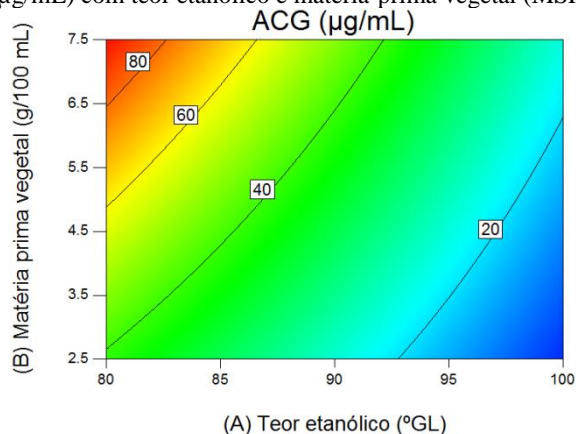
Em relação ao teor de ACG em resíduo seco, os resultados obtidos variaram na faixa de 0,98 a 3,23 % (m/m), valores superiores àqueles observados no delineamento de triagem. Os resultados encontrados indicam que a expansão do domínio experimental na porção superior do fator A e inferior do fator B foi interessante, por permitir a identificação de condições melhores àquelas previamente verificadas.

Ao avaliar os resultados por ANOVA, percebe-se que todos os termos primários, quadráticos e a interação entre eles apresentaram relevância estatística, sendo eles: fator A (teor etanólico; $p = 0,0006$, coeficiente = 0,20), B (matéria-prima vegetal; $p < 0,0001$, coeficiente = -0,50), AB ($p < 0,0001$, coeficiente = -0,47), A^2 ($p < 0,0001$, coeficiente = 0,44) e B^2 ($p < 0,0001$, coeficiente = 0,33). O modelo matemático que

rege essa resposta apresentou relevância estatística ($p < 0,0001$) e o intercepto foi 1,14. O *lack of fit* não foi relevante. O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9937), R^2 ajustado (0,9892) e R^2 preditivo (0,9647), validando o modelo como ferramenta preditiva para otimização. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

$$ACG \text{ em RS (\%)} = 1,14 + 0,20 * A - 0,57 * B - 0,47 * AB + 0,44 * A^2 + 0,33 * B^2 \quad (26)$$

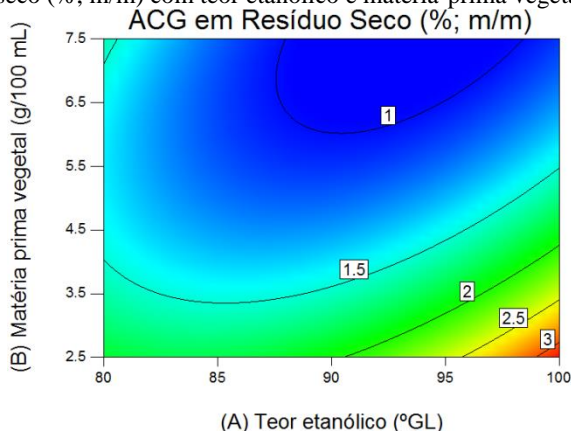
Figura 34. Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico ($\mu\text{g/mL}$) com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR).



Conforme demonstrado na Figura 35, é possível perceber claramente a formação de um *plateau* para esta resposta. O *plateau* formado reflete o comportamento em função dos termos quadráticos A^2 e B^2 , caracterizando o alcance de uma região onde se obtém o mínimo de teor de ACG em resíduo seco possível dentro do domínio experimental avaliado. Embora a formação deste *plateau* seja algo desejado em um processo de otimização, ressalta-se aqui que o objetivo deste estudo é a maximização desta resposta, e não a minimização. Desta forma, a região compreendida acima de 5,5 g de matéria-prima vegetal/100 mL de líquido extrativo é indesejável e deve ser evitada no processo de otimização. Novamente aqui se destaca a importância na redução da massa de matéria-prima vegetal empregada, uma vez que promove uma melhora significativa dessa resposta.

Notou-se, conforme esperado, um aumento no teor de ACG em resíduo seco à medida que se aumenta o teor etanólico. Tal fato ocorre, conforme mencionado previamente, pela promoção de um processo mais seletivo, com menor extração de componentes de pouco interesse a partir da matriz biológica, promovendo assim a concentração do ACG no resíduo seco.

Figura 35. Gráfico de contorno correlacionando o teor de ácido clorogênico em resíduo seco (%; m/m) com teor etanólico e matéria-prima vegetal (MSR).



3.3.4.4 Otimização quimiométrica

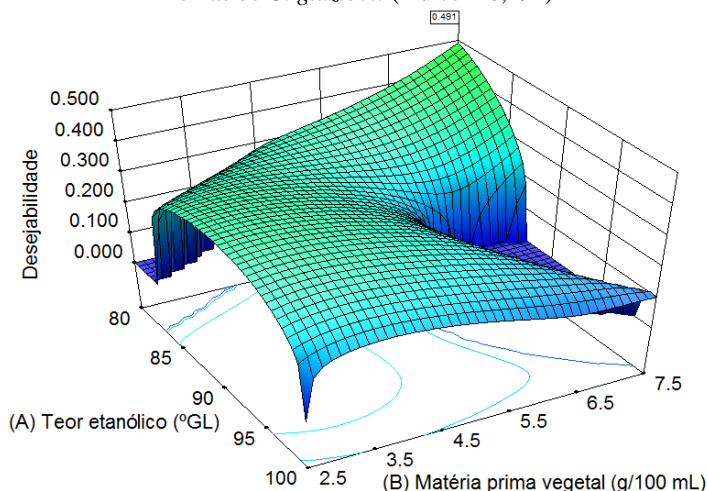
Com base nos dados obtidos e nos modelos matemáticos desenhados por meio do delineamento de Superfície de Resposta IV-*Optimal*, é possível utilizar ferramentas computadorizadas multifunção para o melhoramento concomitante de diferentes respostas, buscando uma condição extrativa ótima com base nos objetivos do trabalho. Em experimentos complexos como esse, é comum observar respostas cujas condições ótimas vão contra aquelas de outras, como, nesse caso, para os teores de marcadores no extrato bruto e no resíduo seco. Sendo assim, por meio da ferramenta de desejabilidade, é possível atribuir importâncias para cada resposta, enfatizando as mais importantes em detrimento de outras. Dessa forma, o processo de otimização pode ser realizado buscando satisfazer todos os requerimentos da forma mais adequada possível.

Por meio do *software* Design-Expert®, inúmeras combinações entre as condições experimentais são traçadas e um índice de desejabilidade é atribuído a essas condições. Quanto mais próximo de

1,0 esse índice, mais adequada as condições encontradas são em relação às condições impostas. Vale ressaltar que um processo de otimização multifatorial usualmente leva a valores de desejabilidade relativamente baixos, uma vez que é bastante difícil satisfazer todas as condições impostas (ARMSTRONG, 2006; MYERS et al., 2009). Na realidade, um baixo índice de desejabilidade, mas que corresponda ao maior índice possível, não indica um processo de otimização falho, e sim um processo que satisfaz o máximo possível os objetivos dentro da realidade experimental.

Sendo assim, o processo de otimização multifatorial foi empregado buscando maximizar o resíduo seco (importância = 3), teor de fenólicos totais no extrato bruto (importância = 2) e no resíduo seco (importância = 5) e teor de ácido clorogênico no extrato bruto (importância = 2) e no resíduo seco (importância = 5). As importâncias foram atribuídas em uma escala de 1 a 5. Como resultado, obteve-se como melhor condição aquela empregando teor etanólico de 80 °GL e 7,5 g de matéria-prima vegetal/100 mL líquido extrator. Tal condição apresentou índice de desejabilidade de 0,491, conforme demonstrado no gráfico de desejabilidade (Figura 36). A condição otimizada não foi aquela que apresentou o máximo possível de teores no resíduo seco, entretanto foi aquela que conseguiu equilibrar ao máximo as respostas, de acordo com as importâncias atribuídas.

Figura 36. Gráfico de desejabilidade para a otimização do processo extrativo de folhas de *C. glaziovii* (índice = 0,491)



A Tabela 17 mostra as respostas previstas para a condição extrativa otimizada e aquelas encontradas para os três experimentos confirmatórios realizados. Os resultados encontrados para os experimentos demonstram a concordância dos resultados previstos e os resultados reais, novamente confirmando a capacidade dos modelos matemáticos em prever as referidas respostas.

Tabela 17. Respostas previstas e experimentais para as condições extrativas otimizadas

Resíduo seco (%; m/m)	Fenólicos totais (mg/mL)	Fenólicos em RS (%; m/m)	ÁCG (µg/mL)	ACG em RS (%; m/m)
<u>Respostas previstas</u>				
0,78	2,1	31,10	91,6	1,61
<u>Experimentos de confirmação (n = 3)</u>				
0,83	2,3	32,47	93,7	1,72
0,80	2,2	34,12	94,2	1,69
0,84	2,3	33,09	94,1	1,65

3.3.4.5 Preparação do turboextrato seco otimizado (TESO)

A partir das condições previamente otimizadas para o processo extrativo, foi realizada a preparação de grande quantidade de extrato vegetal seco, aqui denominado turboextrato seco otimizado (TESO) de *C. glaziovii*. Ao todo, 6 litros de extrato foram preparados, concentrados e secos por liofilização, rendendo aproximadamente 49 g de TESO. O TESO se apresentou como um pó aparentemente de baixo fluxo, volumoso, de odor característico e coloração marrom com uma tonalidade levemente esverdeada, conforme demonstrado na Figura 37.

Figura 37. Turboextrato seco otimizado de *C. glaziovii*.



Ao caracterizar quimicamente o pó obtido, seu teor de fenólicos totais, em equivalente de ácido gálico, foi de $34,2 \pm 0,3$ % (m/m). O teor de ácido clorogênico foi de $1,63 \pm 0,08$ % (m/m). O teor de umidade do pó, determinado por técnica gravimétrica (BRASIL, 2010), foi de $2,45 \pm 0,12$ %.

3.3.5 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

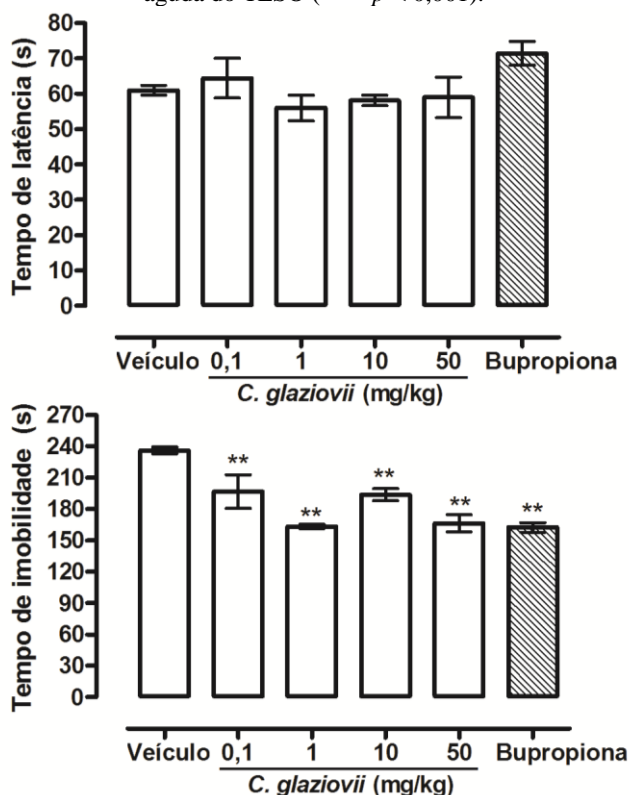
A determinação da capacidade de um produto farmacêutico em exercer sua função biológica é de suma importância para um estudo de formulação. Dentre as espécies do gênero *Cecropia*, *C. glaziovii* é uma das que recebe maior interesse na pesquisa científica em decorrência das suas diversas atividades farmacológicas de interesse, como hipoglicemiante (ANDRADE-CETTO; VÁZQUEZ, 2010), tipo-antidepressiva (ROCHA et al., 2007), tipo-ansiolítica (ROCHA et al., 2002), anti-hipertensiva (LIMA-LANDMAN et al., 2007), dentre outras.

Em relação à atividade tipo-antidepressiva, estudos prévios de Rocha e colaboradores (2007) demonstraram a existência dessa atividade após administração oral de um extrato aquoso e sua fração butanólica em ratos. Embora os resultados demonstrados sejam promissores, a falta de padronização e otimização do processo extrativo pode acarretar na necessidade de administração de altas doses para ocorrência de efeito biológico, conforme verificado pelos autores. Por essa questão, nesse trabalho se optou por uma estratégia quimiométrica para otimizar a preparação de um extrato hidroetanólico de *C. glaziovii*, buscando concentrar os compostos fenólicos e ácido clorogênico em sua forma final e, assim, possivelmente obter resultados melhorados para esta atividade.

Em decorrência do grande número de animais necessários à avaliação da atividade tipo-antidepressiva *in vivo*, optou-se por avaliar inicialmente somente o TESO para assim verificar a ocorrência de resposta farmacológica.

Em relação ao tratamento agudo, após a administração oral do TESO e avaliação no teste do nado forçado, verificou-se que não ocorreu alteração no tempo de latência médio para os grupos tratados com extrato em relação aos grupos tratados somente com o veículo. Da mesma forma, a bupropiona, na dose de 10 mg/kg, não alterou o tempo de latência (Figura 38, gráfico superior).

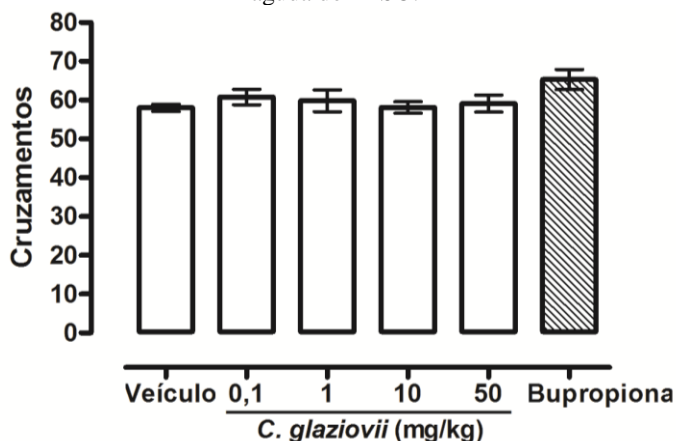
Figura 38. Resultados obtidos para o teste do nado forçado após administração aguda do TESO (** = $p < 0,001$).



Ao avaliar o tempo de imobilidade (Figura 38, gráfico inferior), notou-se uma redução bastante importante em todos os grupos tratados com TESO, sendo que a magnitude da redução no tempo de imobilidade foi bastante semelhante à observada para a bupropiona (10 mg/kg). A redução no tempo de imobilidade indica um aumento na reação de fuga dos animais frente a uma situação de risco, característica comumente desencadeada pela administração de compostos com atividade antidepressiva (ABELAIRA et al., 2013). É importante destacar que, por se tratar de um ensaio comportamental, não é possível afirmar que um grupo apresentou melhor resultado que outro, somente é possível indicar a existência de um efeito tipo-antidepressivo nos grupos tratados com o TESO em diferentes doses.

Ao avaliar o número de cruzamentos realizados pelos animais no teste do campo aberto, verificou-se que não houve diferença relevante entre os cruzamentos realizados pelos animais tratados com TESO e aqueles tratados com veículo (Figura 39), indicando que o extrato vegetal não promoveu efeitos de hipo ou hiperlocomobilidade. Desta forma, validando os resultados observados no teste do nado forçado. Algumas substâncias, por apresentarem capacidade de causar efeito de hiperlocomobilidade, podem acarretar em resultados falso positivos para o teste do nado forçado (ABELAIRA et al., 2013). Tal questão é crítica, em especial na avaliação de extratos vegetais em decorrência da sua natureza química complexa e não completamente elucidada. Por essa razão, o teste do campo aberto é bastante relevante como ferramenta de validação aos resultados obtidos para o teste do nado forçado.

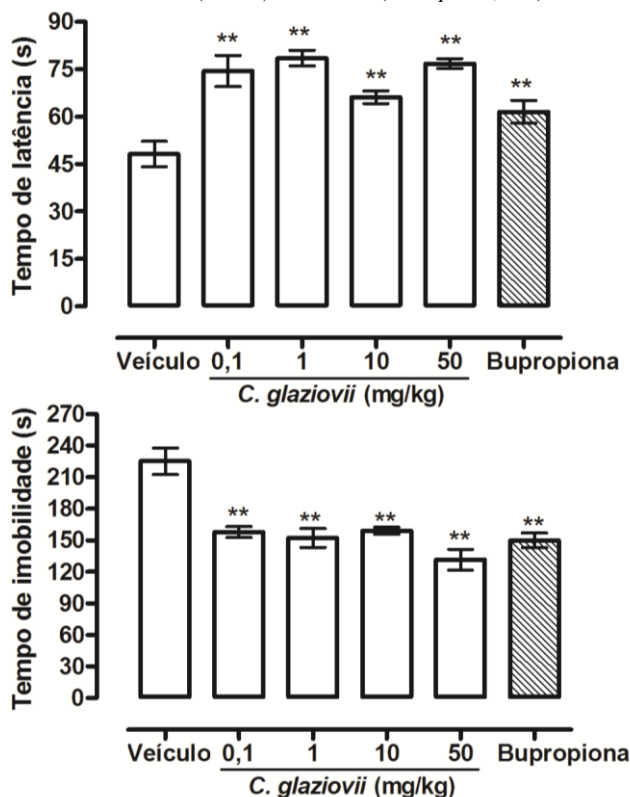
Figura 39. Resultados obtidos para o teste do campo aberto após administração aguda do TESO.



Em relação aos animais submetidos ao tratamento subcrônico (6 dias), interessante foi possível verificar alterações no tempo de latência prévio ao primeiro episódio de imobilidade. Esse aumento verificado aqui não havia sido notado previamente nos animais submetidos ao tratamento agudo. Em geral, o tempo de latência para todos os grupos tratados com TESO apresentou aumento relevante em relação ao grupo tratado com o veículo (Figura 40, gráfico superior), indicando uma maior tendência dos animais a permanecer em movimento logo após serem submetidos a uma situação de perigo

(CASTAGNÉ et al., 2009). Esse efeito é interessante por possivelmente indicar um efeito acumulativo da administração do TESO, gerando melhores resultados em tratamentos crônicos e possivelmente justificando o uso desse extrato para preparação de um produto farmacêutico de liberação prolongada.

Figura 40. Resultados obtidos para o teste do nado forçado após administração subcrônica (6 dias) do TESO (** = $p < 0,001$).

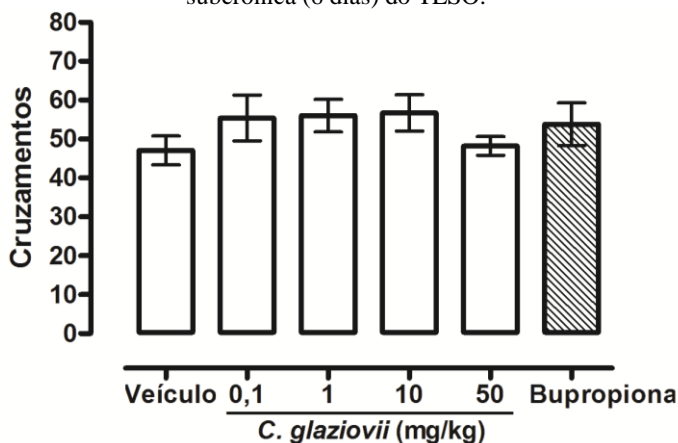


Com relação ao tempo de imobilidade (Figura 40, gráfico inferior), todos os grupos tratados com TESO apresentaram atividade relevante em relação ao grupo tratado com veículo.

Ao avaliar o número de cruzamento desses animais no teste do campo aberto, verificou-se que não houve modificação nos números de eventos dos grupos tratados com TESO em relação ao veículo (Figura

41), validando desta forma os resultados apresentados no teste do nado forçado.

Figura 41. Resultados obtidos para o teste do campo aberto após administração subcrônica (6 dias) do TESO.



Em suma, conclui-se que a estratégia quimiométrica adotada no desenvolvimento e otimização desse extrato vegetal foi bem sucedida, uma vez que o produto obtido apresentou atividade tipo-antidepressiva no teste de nado forçado em condições bastante promissoras para o desenvolvimento fitofarmacotécnico, apresentado na sequência deste trabalho.

3.4 CONCLUSÃO

No desenvolvimento de produtos fitofarmacêuticos, um dos maiores desafios é assegurar a reprodutibilidade e eficácia do produto desenvolvido. Nesse capítulo, visou-se a identificação e caracterização extensa do processo de extração por força de cisalhamento, uma vez que é uma técnica pouco explorada, entretanto muito promissora. Por meio de um sistema rotor-estator, é possível submeter a matéria-prima vegetal a uma tensão de cisalhamento bastante elevada, promovendo a ruptura das células vegetais e redução no tamanho de partícula da matéria-prima. Assim, facilita-se o acesso do solvente extrativo às substâncias de interesse, acelerando substancialmente o processo de extração, de forma muito mais eficiente quando comparado às técnicas clássicas, tais como a maceração e decocção.

Após extensivo estudo, notou-se claramente que, no processo de extração por força de cisalhamento, as condições que promovem a obtenção de extratos concentrados nos marcadores químicos avaliados no resíduo seco são inversas àquelas que promovem a sua concentração no estado líquido. Por essa razão, faz-se necessário ter em mente quais são os objetivos do processo de extração, uma vez que a secagem de extratos líquidos concentrados para obtenção de pós acarreta em um produto cujos marcadores e substâncias de interesse se encontram diluídas, potencialmente prejudicando a bioatividade do produto. Sendo assim, no processo de otimização, optou-se por condições brandas de extração, que não concentram tanto o extrato no estado líquido, entretanto, por promover uma extração mais seletiva, acarretam na obtenção de pós secos ricos em compostos fenólicos.

Dessa forma, o turboextrato seco otimizado (TESO) foi obtido, contendo teores de fenólicos totais, em equivalente de ácido gálico, de $34,2 \pm 0,3$ % (m/m) e de ácido clorogênico de $1,63 \pm 0,08$ % (m/m). O extrato final contém somente traços não quantificáveis de ácido cafeico.

O TESO foi caracterizado quanto à sua atividade farmacológica tipo-antidepressiva *in vivo* em camundongos. Os resultados obtidos se mostraram extremamente promissores para um extrato bruto vegetal, com atividade detectada em doses inferiores a 1 mg/kg de TESO.

Por fim, os resultados validaram a estratégia experimental escolhida, iniciando-se pela aplicação de um delineamento fatorial de triagem e seguindo com um delineamento do tipo Metodologia de Superfície de Resposta, buscando a otimização do processo. Por meio desta abordagem quimiométrica, foi possível obter o máximo de informações possível com um número significativamente reduzido de experimentos e, assim, obter um extrato vegetal seco otimizado de forma racional e com comprovada bioatividade aprimorada.

**Preparação e associação de microesferas
poliméricas de *C. glaziovii* Snethl. a sistemas
carreadores multiparticulados**

4 PREPARAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE MICROESFERAS DE *Cecropia glaziovii* Snethl. A SISTEMAS CARREADORES MULTIPARTICULADOS

4.1 INTRODUÇÃO

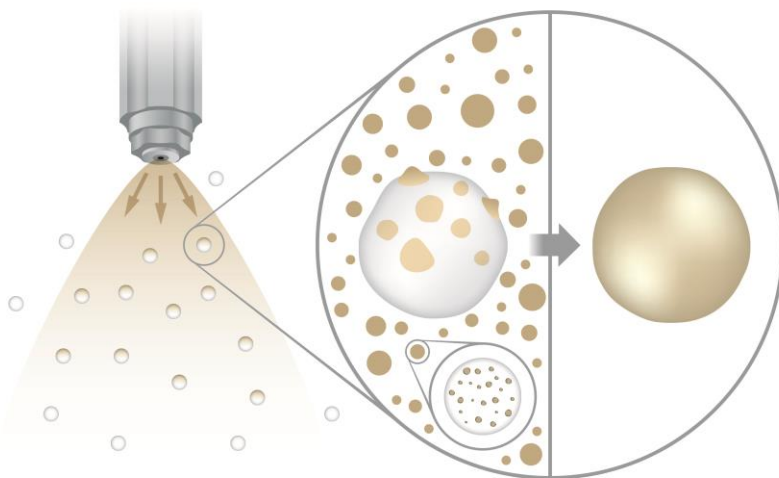
O uso de sistemas micro e nanoestruturados, como forma de controle e vetorização de fármacos, é uma tendência crescente na indústria cosmética e farmacêutica. Entretanto, o uso desse tipo de sistema na forma sólida gera desafios no que tange suas propriedades mecânicas de fluxo e compressibilidade, uma vez que conceitualmente se tratam de partículas de tamanho reduzido. Como forma de contornar estes problemas, diversas estratégias têm sido abordadas e essas são alvo de crescentes pedidos de proteção intelectual, exaltando a importância técnica que esse tipo de estudo apresenta.

Nesse capítulo, explora-se o desenvolvimento de uma formulação modelo de partículas submicrométricas poliméricas de PLGA contendo o turboextrato seco de *C. glaziovii* (TESO). O extrato vegetal em questão foi empregado como insumo ativo farmacêutico modelo, por se tratar de um pó altamente higroscópico. Essa característica, além de promover forças capilares de adesão interparticular (CROWDER; HICKEY, 2000; EMERY et al., 2009), apresenta desafios associados à estabilidade do produto final. Assim sendo, o extrato vegetal se apresenta como ativo modelo apropriado para incorporação nos sistemas microestruturados.

As microesferas poliméricas são promissores sistemas de controle de liberação. Entretanto, quando apresentam tamanho de partícula inferior a 10 µm, tamanho pretendido nesse trabalho por favorecer o aumento na superfície específica do sistema e aumentar a reatividade com membranas biológicas, tornam-se mais susceptíveis às forças interparticulares relacionadas às propriedades mecânicas (CROWDER; HICKEY, 2000). Dessa forma, como estratégia para melhora das propriedades mecânicas das microesferas, explorou-se a incorporação dessas em núcleos inertes multiparticulados. Os núcleos são constituídos de *pellets* de celulose microcristalina, preparados pela técnica de extrusão-esferonização. Essa forma farmacêutica foi escolhida por apresentar propriedades de fluxo livre e superfície esférica relativamente lisa, o que torna essa ideal para estudos de revestimento (CHOPRA et al., 2002). A associação das microesferas poliméricas nos *pellets* foi explorada por meio da técnica de revestimento em leito fluidizado, utilizando como componentes adesivos polímeros hidrofílicos da classe do álcool polivinílico. Basicamente, avaliou-se a

preparação de dispersões das micropartículas em soluções dos polímeros e sua seguinte deposição na superfície dos *pellets*, com consequente adesão pela formação de filme polimérico (Figura 42). Devido ao caráter altamente hidrofílico, os polímeros se dissolvem ao entrar em contato com os fluidos biológicos, liberando as partículas no meio gástrico, onde serão responsáveis pelo controle de liberação e/ou vetorização do insumo ativo farmacêutico.

Figura 42. Esquema de preparação dos *pellets* revestidos com microesferas poliméricas por meio da técnica de leito fluidizado.



4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Os seguintes materiais, reagentes e solventes foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho: álcool etílico absoluto, ácido trifluoracético, azul de metileno, diclorometano e hidróxido de sódio (Vetec, Brasil); metanol e acetonitrila grau CLAE (J.T. Backer, EUA); ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico) padrão primário e álcool polivinílico (Sigma-Aldrich, EUA); Kollidon[®] VA64 (copolímero de polivinil pirrolidona e vinilacetato; PVP-PVAc) e Kollicoat[®] Protect (copolímero de álcool polivinílico e polietileno glicol com álcool polivinílico; PVA-PEG-PVA) (BASF, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas com água destilada, com exceção daquelas voltadas à CLAE, onde se usou água ultrapura obtida em sistema Milli-Q

(Millipore, EUA). Os *pellets* inertes (diâmetro médio de 1,0 mm), constituídos de celulose microcristalina 101 e preparados pela técnica de extrusão-esferonização, foram doados pela Blanver Farmoquímica (Microcel Pellets®; Brasil). Todos os reagentes e solventes não mencionados são grau analítico.

4.2.2 Preparação das microesferas de *C. glaziovii*

O processo de preparação das microesferas de *C. glaziovii* foi estudado empiricamente para obtenção de partículas com características morfológicas adequadas como partículas modelo para este estudo. Partiu-se de informações da literatura (DOS SANTOS, 2012) e de experimentos prévios (dados não demonstrados) para padronizar condições como tempo de emulsificação e quantidades de polímero e extrato empregados.

A preparação das microesferas poliméricas de *C. glaziovii* foi feita por meio da técnica de dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente, adaptada com base no descrito por Dos Santos e colaboradores (2012). As modificações na técnica previamente descrita foram realizadas com finalidade à obtenção de partículas com diâmetro médio inferior a 10 μm . Na preparação, o TESO (12,5 mg) foi solubilizado em 500 μL de solução 0,5 % (m/v) de hidróxido de sódio, constituindo assim a fase aquosa interna do sistema (a_1). Essa fase foi emulsificada com a fase oleosa (o) constituída de 100 mg de PLGA 503H solubilizado em 8 mL de diclorometano, obtendo a emulsão primária (a_1/o). A emulsão resultante, de caráter lipofílico, foi então reemulsificada na fase aquosa externa (a_2), constituída de 80 mL de solução de álcool polivinílico 0,5 % (m/v) e cloreto de sódio 3 % (m/v), obtendo assim a emulsão $a_1/o/a_2$. Ambas as emulsificações foram realizadas fazendo uso do homogeneizador Ultra-turrax® modelo T25 Basic (IKA, Alemanha), equipado com hastes dispersoras S25N-10G (emulsão primária; 13500 rpm por 2 min) e S20-25NK-19G (emulsão secundária; 13500 rpm por 1 min). Após a preparação da emulsão, a extração do solvente da fase oleosa foi realizada por meio da adição de 100 mL de solução de álcool polivinílico 0,1 % (m/v) e cloreto de sódio 3 % (m/v). A dispersão resultante foi mantida em agitação magnética por 1 h e 30 min, em temperatura ambiente (25 °C), para completa evaporação do solvente orgânico. As microesferas foram então centrifugadas a 4000 rpm (FCR = 3256) por 10 min, separadas da fase líquida e ressuspensas em 100 mL de água purificada para remoção de resíduos. O processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. Após, as microesferas foram ressuspensas em 2 mL de água purificada,

congeladas por 24 h e secas por criodessecação em equipamento liofilizador (LD1500, Terroni, Brasil) por 48 h.

As micropartículas obtidas foram caracterizadas quanto ao seu teor e eficiência de encapsulação do TESO, densidades aparente, de compactação e real, índices de Hausner e de Carr, ângulo de repouso estático, contagem particular e perfil de liberação, conforme descrito posteriormente no decorrer deste capítulo.

4.2.2.1 Análise de espalhamento de luz laser

As análises de espalhamento de luz laser, visando à determinação de parâmetros dimensionais das partículas, foram realizadas em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Reino Unido), equipado com unidade óptica duplo laser feixe convergente de Hélio/Neônio (632,8 nm) e LED (470 nm). As amostras foram analisadas em câmara de dispersão aquosa Hydro 2000SM (Malvern, Reino Unido) a 1500 rpm. Os resultados foram determinados por meio da teoria de difração de Fraunhofer, adequada para partículas cujo tamanho médio esperado é superior ao comprimento de onda da luz incidente (KECK; MULLER, 2008). A teoria parte do pressuposto que o padrão de difração da luz incidida em uma amostra é dependente do tamanho das partículas que a compõe. Dessa forma, o diâmetro médio por volume equivalente ($D[4,3]$) é calculado por meio da fórmula:

$$D[m, n] = \left[\frac{\sum Vi \times di^{m-3}}{\sum Vi \times di^{n-3}} \right]^{\frac{1}{m-n}} \quad (27)$$

Onde, Vi é o volume relativo da partícula e di é o diâmetro médio, m e n se referem aos momentos da distribuição da partícula.

Partindo da Equação 27, determinam-se também os índices $D(0,1)$, $D(0,5)$ e $D(0,9)$, os quais representam o diâmetro por volume equivalente ao qual 10, 50 e 90 % das partículas são menores. Com essa informação, calcula-se o Span como indicativo da polidispersão da amostra (Equação 28). Nesse índice, quanto mais próximo de zero, mais monodispersa é a amostra.

$$Span = \frac{[D(0,9) - D(0,1)]}{D(0,5)} \quad (28)$$

Outra determinação importante nessa técnica é a área de superfície específica (ASE; Equação 29), a qual é calculada tendo como base a densidade real da amostra (ρ_r), partindo da premissa de que a amostra se trata de esferas perfeitas não porosas. Para essa determinação, a densidade real das amostras foi medida previamente conforme descrito na seção 4.2.5.5.

$$ASE = \frac{6}{\rho_r \times D[3,2]} \quad (29)$$

A preparação das amostras para análise foi realizada por dispersão prévia em 10 mL de água purificada. A dispersão foi alcançada por irradiação ultrassônica utilizando um sonotrodo UP200S (Hielscher, Alemanha) com potência de 200 W em amplitude de 50 % por 2 min. A adição das amostras na câmara dispersora foi feita até alcançar obscurecimento de luz na faixa de 10 a 15 %, o qual se refere à quantidade de luz espalhada ou absorvida pela amostra. Todas as leituras expressam o resultado médio de 20 determinações.

4.2.2.2 Eficiência de encapsulação e teor de TESO

A eficiência de encapsulação, índice que determina a quantidade do insumo ativo que foi efetivamente incorporado na estrutura da partícula, foi determinada por espectroscopia na região do ultravioleta (conforme seção 4.2.2.3), após extração líquido-líquido do TESO encapsulado nas microesferas.

Brevemente, 20 mg das microesferas secas foram pesadas e dissolvidas em 3 mL de diclorometano com auxílio de irradiação ultrassônica por 2 min (UP200S; Hielscher, Alemanha). Após, 4 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5 % (m/v) foram adicionados e a mistura foi submetida a irradiação ultrassônica por mais dois minutos. A emulsão resultante foi separada por centrifugação a 2000 rpm (FCR = 814) por 30 min e a porção aquosa analisada em 280 nm. O teor e a eficiência de encapsulação foram determinados por meio das equações 30 e 31, respectivamente:

$$Teor (\%) = \left(\frac{[TESO]}{m} \right) \times 100 \quad (30)$$

$$EE (\%) = \left(\frac{Teor}{Teor\ te\acute{o}rico} \right) \times 100 \quad (31)$$

4.2.2.3 Espectroscopia no ultravioleta do TESO

Com finalidade analítica, foi delineada uma metodologia para quantificação do TESO em espectroscopia na região do ultravioleta para determinação de parâmetros como eficiência de encapsulação e teor de TESO. A escolha dessa técnica em detrimento ao CLAE, previamente empregado na preparação dos extratos, foi decorrente da impossibilidade técnica de quantificar os marcadores encapsulados, uma vez que far-se-ia necessário o consumo de grande quantidade de microesferas para obter concentrações quantificáveis dos marcadores.

Foram preparadas soluções de TESO em hidróxido de sódio 0,5 % (m/v) nas concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. Para determinação da linearidade, o coeficiente de correlação da reta foi determinado para as leituras de três curvas, cada uma em triplicata. A partir das curvas analíticas, foram determinados os limites de quantificação e detecção por meio das equações 5 e 6, respectivamente. Todas as leituras foram realizadas em 280 nm.

A precisão do método foi averiguada por meio da repetibilidade, pela avaliação de três concentrações (5, 50 e 100 µg/mL) em três períodos distintos do mesmo dia. Também se avaliou a precisão intermediária, por meio da avaliação das mesmas três concentrações em três dias distintos. Para ambos os parâmetros, esperaram-se variações inferiores a 5 % entre as leituras.

A exatidão do método, por sua vez, foi averiguada por meio da contaminação da solução de concentração conhecida de TESO com concentrações do mesmo extrato, alcançando concentrações finais de 125, 150 e 175 % em relação à concentração inicial. Posteriormente, executou-se a extração líquido-líquido, conforme descrito na seção 4.2.2.2, e a porção aquosa foi avaliada. A porcentagem recuperada foi determinada por meio da correlação entre a concentração teórica final e a concentração encontrada experimentalmente.

4.2.3 Fracionamento dos *pellets* inertes

Os *pellets* inertes, preparados pela técnica de extrusão-esferonização e constituídos somente de celulose microcristalina (Microcel[®] MC-101, Blanver, Brasil) foram doados pela Blanver Farmoquímica Ltda. (Brasil). A partir da matéria-prima, cujo diâmetro médio declarado é de 1000 µm, procedeu-se o fracionamento utilizando

tamises na faixa de 850 a 1000 μm , fração essa denominada “fração útil”. O rendimento do fracionamento foi determinado por meio da correlação entre a massa total fracionada e a massa de *pellets* retida no intervalo granulométrico de interesse.

A fração útil dos *pellets* inertes foi caracterizada por meio da determinação de suas densidades aparente, de compactação e real, índices de Hausner e de Carr, esfericidade e ângulo de repouso estático, conforme descrito posteriormente.

4.2.4 Estudos para associação das microesferas aos *pellets*

A associação das microesferas contendo TESO de *C. glaziovii* foi avaliada por meio da técnica de revestimento pelicular, fazendo uso de polímeros hidrofílicos como agentes adesivos. Com essa finalidade, dois copolímeros foram selecionados tendo como base suas características físico-químicas e seu uso histórico como excipientes farmacêuticos.

O copolímero de polivinil pirrolidona e vinilacetato (PVP-PVAc; Kollidon® VA64, BASF, Alemanha), também conhecido como Copovidona, é um agente aglutinante com capacidade para formação de filmes. Já o Kollicoat® Protect (BASF, Alemanha) é uma mistura comercial constituída do copolímero de álcool polivinílico e polietileno glicol (55 – 65 %) com álcool polivinílico (35 – 45 %) (PVA-PEG-PVA), desenvolvida especialmente para formação de revestimentos hidrossolúveis de baixa permeabilidade à umidade. A associação das microesferas aos *pellets* foi realizada por meio da dispersão destas em soluções contendo os polímeros previamente selecionados, seguido da aspersão da dispersão na superfície dos núcleos fazendo uso de um leito fluidizado tipo *top-spray*.

Como parâmetro importante em um estudo de revestimento, a determinação das condições que promoverão adequado revestimento da superfície dos *pellets* inertes é essencial. Sendo assim, para ambos os polímeros adesivos, foram avaliadas diferentes concentrações do polímero e diferentes volumes de líquidos de revestimento. Todas as soluções avaliadas continham uma concentração fixa de 5 mg/mL de microesferas contendo TESO de *C. glaziovii*. Às soluções, foi adicionado azul de metileno na concentração de 0,01 % (m/v) para garantir visibilidade do revestimento, uma vez que os filmes poliméricos formados são transparentes.

Os testes iniciais para associação das microesferas aos *pellets* foram realizados utilizando 5 g de *pellets* inertes (fração útil de 850 – 1000 μm) dispostos na câmara de um leito fluidizado *top-spray* (Mini

Coater Drier-2, Caleva, Inglaterra), submetidos à agitação na frequência de 13 Hz em fluxo de ar de 12,5 m³/s com temperatura de entrada de 50 °C. As soluções/dispersões de revestimento foram aspergidas no sistema a uma pressão de 1,5 bar em velocidade de 0,5 mL/min controlada por uma bomba peristáltica (1,3 rpm). Após completa aspersão, os *pellets* revestidos foram secos por 10 min a 60 °C. Todos os parâmetros de revestimento foram determinados empiricamente como os mais adequados para evitar aglomeração por excesso de molhagem dos *pellets*.

Para triagem dos fatores envolvidos neste processo, foi utilizado um delineamento experimental do tipo fatorial com processamento em algoritmo IV-*Optimal*. O planejamento em questão se constituiu de 20 experimentos com quatro pontos centrais para estimativa de erro. Nesse estudo, foram avaliados os seguintes fatores: (A) tipo de polímero, (B) concentração do polímero (%; m/v) e (C) proporção de solução de revestimento (mL) por grama de *pellets* inertes. O domínio experimental se encontra descrito na Tabela 18. Todos os fatores foram avaliados em três níveis (mínimo, central e máximo), com exceção do fator A por se tratar de um fator categórico.

Tabela 18. Domínio experimental do planejamento fatorial para avaliação de fatores relacionados à associação de microesferas a *pellets* inertes.

Fator	Níveis		
	Mínimo	Central	Máximo
(A) Tipo de polímero	PVA-PEG-PVA	-	PVP-PVAc
(B) Concentração do polímero (%; m/v)	1,0	2,5	5,0
(C) Proporção de revestimento por <i>pellets</i> (mL/g)	1:1	2:1	3:1

Como resposta, foi avaliada a superfície total revestida, uma vez que a intenção neste estudo é a determinação das condições necessárias para cobrir a área superficial total dos *pellets* inertes.

O planejamento apresentado nesta seção foi analisado fazendo uso do *software* Design-Expert® 8.0.7.1 (Stat-Ease Inc., EUA). As

relevâncias estatísticas de termos hierárquicos, interações e termos quadráticos foram determinadas por meio de análise de variância. Fatores com valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes. Termos não relevantes foram excluídos dos modelos matemáticos polinomiais, a menos que estivessem envolvidos em interações como termos hierárquicos.

Para determinação da superfície total revestida, foi utilizada análise RGB (*Red, Green, Blue*) de imagem (FOCA et al., 2011). As formulações foram dispostas em placa de vidro preta, analisadas em estereoscópio de luz (SZX16, Olympus, Brasil) e microfotografias das formulações foram captadas em ambiente com luminosidade controlada a 25 lux (LightMeter HS1010, China). Um mínimo de 200 partículas foram analisadas por formulação. As imagens foram processadas fazendo uso do *software* ImageJ (1.45s, National Institutes of Health, EUA) e histogramas de cor RGB foram desenhados utilizando o *plug-in* Color Inspector 3D (2.0, FHTW, Alemanha).

As frequências dos tons RGB por pixels das imagens foram transformadas em porcentagens. As superfícies cobertas foram determinadas por comparação do perfil RGB das formulações revestidas com a fração de *pellets* não revestida. Em todas as análises, os tons em codificação RGB preto (0, 0, 0) e similares foram eliminados em decorrência do fundo de coloração preta das imagens analisadas.

4.2.5 Preparação e caracterização dos sistemas multiparticulados revestidos com microesferas de *C. glaziovii*

Com vistas à obtenção de uma quantidade suficiente de *pellets* contendo microesferas para continuação da caracterização do sistema, três lotes de 20 g cada foram preparados a partir das condições otimizadas de incorporação das microesferas aos *pellets*. Os 20 g de *pellets* inertes (fração útil de 850 – 1000 μm) foram dispostos na câmara de um leito fluidizado *top-spray* (Mini Coater Drier-2, Caleva, Inglaterra), submetidos à agitação na frequência de 13 Hz em fluxo de ar de 14,0 m^3/s com temperatura de entrada de 50 °C. As soluções/dispersões de revestimento foram aspergidas no sistema a uma pressão de 1,5 bar em velocidade de 1,5 mL/min controlada por uma bomba peristáltica (2 rpm). Após completa aspersão, os *pellets* revestidos foram secos por 10 min a 60 °C.

Cada formulação foi revestida com três camadas de microesferas dispersas em concentração de 5 mg/mL, desta forma, totalizando, teoricamente, 600 mg de microesferas em 20 g de *pellets* inertes. O sistema final obtido foi então caracterizado quanto ao seu teor

de microesferas, características morfológicas, densidades real, aparente e de compactação, índices de Carr e Hausner, ângulo de repouso, capacidade de desassociação e desagregação das microesferas da superfície dos *pellets* e liberação do TESO de *C. glaziovii* a partir das microesferas associadas.

4.2.5.1 Determinação do teor de microesferas associadas à superfície dos *pellets*

A quantificação do teor de microesferas efetivamente associadas aos *pellets* inertes foi realizada por meio de técnica de contagem visual em lâmina K-Cell (Intralab, Brasil). Essa técnica permite a determinação do número de partículas dispersas em uma amostra por meio da observação visual em microscopia de luz. O número de partículas observado na amostra foi convertido em massa de microesferas fazendo uso de uma curva analítica preparada nas seguintes concentrações de microesferas: 10, 25, 50, 150, 250, 500 e 750 µg/mL. As diluições das microesferas foram preparadas partindo de uma concentração padrão de 5 mg/mL, dispersa com auxílio de irradiação ultrassônica (UP200S, Hielscher, Alemanha) por 2 min para garantir a desaglomeração total das partículas. A faixa de concentração foi adotada tendo como base a quantidade máxima cuja contagem foi possível sem sobreposição das partículas na câmara. A partir das curvas analíticas, determinou-se o coeficiente de correlação e a equação da reta que rege o sistema. Dessas, também se determinou os limites de quantificação e detecção, com base nas Equações 5 e 6.

A validade da lâmina K-Cell® para quantificação de microesferas em *pellets* foi investigada na presença de diferentes contaminantes, sendo eles a celulose microcristalina 101 (Microcel 101, Blanver, Brasil) e *pellets* inertes previamente moídos em gral de vidro. Essa investigação foi adotada uma vez que estes materiais particulados podem facilmente levar a erros de contagem caso tenham dimensões e características morfológicas semelhantes às microesferas. Brevemente, uma mistura binária de dispersões de microesferas e dos agentes contaminantes foi realizada na proporção 1:1 (m/m). A dispersão resultante foi transferida para uma câmara de contagem na lâmina K-Cell e a contagem das microesferas foi realizada por um avaliador cego ao tratamento das amostras. A porcentagem de microesferas contadas em relação ao total foi calculada como a média de três determinações.

Para quantificação dos *pellets* revestidos, uma massa conhecida destes foi dispersa em água previamente filtrada. A dispersão foi mantida em agitação por inversão (Tepron, Brasil) por seis horas. Após,

alíquotas de 100 µL foram imediatamente coletadas e transferidas para células de uma lâmina de contagem tipo K-Cell (Intralab, Brasil). O número de microesferas na área de contagem foi determinado em microscopia de luz com iluminação diascópica de campo claro (Bx41, Olympus, EUA), correspondendo ao número observado em 0,1 µL da dispersão. Dessa forma, calculou-se o número de partículas observadas por mL da dispersão e este valor foi convertido em massa pela aplicação da curva analítica previamente avaliada. Todos os resultados expressam a média aritmética de três determinações.

4.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As avaliações morfológicas da superfície das amostras de microesferas e *pellets* foram realizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em microscópio JSM-6390LV (JEOL, EUA) em voltagem de 10 kV. As amostras no estado seco foram fixadas em suportes de alumínio fazendo uso de fitas de carbono dupla face. Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (Leica EMSCD500, EUA), em câmara de vácuo, e analisadas.

Para avaliação da micromorfologia interna, cortes transversais das amostras foram realizados. As amostras foram submersas em matriz de congelamento à base de polietilenoglicol (Tissue-Tek®, Leica Microsystems, Alemanha) e mantidas por 2 horas a uma temperatura de -20 °C. Os blocos resultantes foram fixados em suportes plásticos e seccionados transversalmente em cortes de espessura de 5 µm, fazendo uso de um micrótomo criostato (CM1850UV, Leica Microsystems, Alemanha), em câmara a -20 °C. Os cortes foram imediatamente transferidos para a fita de carbono e fixados nos suportes de alumínio para posterior recobrimento com ouro (Leica EMSCD500, EUA) e análise microscópica.

4.2.5.3 Microscopia de Epifluorescência

As avaliações em microscopia de epifluorescência foram realizadas em microscópio Bx41 (Olympus, EUA) em filtro vermelho U-MGW2 (excitação = 510 - 550 nm, emissão = 590 nm), disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II (LAMEB II) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para análise das partículas do TESO, essas foram dispersas em água purificada e uma gota da dispersão colocada entre lâmina e lamínula de vidro para análise. A análise dos filmes de revestimento foi feita após remoção deste da superfície dos *pellets*, com auxílio de um bisturi cirúrgico, e locação dos fragmentos de filme entre lâmina e

lâmina de vidro. Já no caso das avaliações da estrutura dos *pellets* revestidos, cortes foram feitos em criostato, conforme descrito na seção 4.2.5.2, e transferidos para lâminas de vidro. Todas as imagens foram capturadas fazendo uso de câmera acoplada (Q-imaging, EUA) com *software* de captura Q-capture Pro 5.1 (Q-imaging, EUA).

4.2.5.4 Determinação da esfericidade dos produtos

O índice de esfericidade dos sistemas multiparticulados foi determinado a partir de microfotografias obtidas utilizando um estereoscópio de luz (SZX16, Olympus, Brasil) e analisadas utilizando o *software* Size Meter versão 1.1 (LCP, UFSC/CTC/EQA, Brasil). O índice de esfericidade foi determinado como a razão entre o maior diâmetro da partícula pelo diâmetro perpendicular a esse (PODCZECK et al., 1999). Os resultados refletem a média da determinação de, no mínimo, 500 partículas por amostra.

4.2.5.5 Determinação das densidades real, aparente e de compactação

A densidade real, ou particular, de todos os produtos preparados foi determinada por meio da técnica de deslocamento gasoso de hélio, utilizando o picnômetro AccuPycII 1340 (Micromeritics Instrument Corporation, EUA). As amostras, previamente pesadas, foram dispostas em cápsulas de aço inox de 10 cm³ com, no mínimo, 90 % do volume total da cápsula preenchido. Gás hélio foi deslocado a uma vazão de 2,2 kg/cm² e a diferença de pressão antes e após a expansão do gás na câmara foi utilizada para determinar o volume real ocupado pelo esqueleto sólido da amostra. Dessa forma, a densidade real é calculada por meio da correlação massa/volume. O resultado final foi expresso como a média de dez determinações da mesma amostra.

A determinação das densidades aparente e de compactação foi realizada por meio de medição volumétrica, conforme descrito pela Farmacopeia Europeia (IV Edição, 2002). Uma massa conhecida do material analisado foi adicionada a uma proveta graduada e o volume inicial em repouso (aparente) foi determinado. Utilizando a relação massa/volume aparente, determina-se a densidade aparente. Posteriormente, a proveta foi submetida a 1250 batidas em um volumetro de compactação (JV1000, Coplay, Reino Unido) e o volume compactado foi anotado. A relação massa/volume compactado foi utilizada para determinação da densidade de compactação. Para ambas as densidades, o resultado reflete a média aritmética de, no mínimo, seis determinações.

4.2.5.6 Determinação dos índices de Hausner e Carr

Os índices de Hausner (IH) (HAUSNER, 1967) e Carr (IC) (CARR, 1965) foram empregados como indicativos de fluxo dos materiais, uma vez que refletem o comportamento mecânico desses em função das forças interparticulares que atuam no sistema. Esses índices são determinados em função das densidades aparente (ρ_a) e de compactação (ρ_c), conforme segue:

$$IC (\%) = 100 \times \left(\frac{\rho_c - \rho_a}{\rho_c} \right) \quad (32)$$

$$IH = \frac{\rho_c}{\rho_a} \quad (33)$$

Para esses índices, consideram-se os seguintes valores em função da capacidade de escoamento do material (Tabela 19):

Tabela 19. Valores de referência para os índices de Hausner e Carr e ângulo de repouso em função do fluxo. Adaptado de Aulton e colaboradores (2013).

Índice de Carr (%)	Índice de Hausner	Ângulo de repouso (°)	Fluxo esperado
< 10	1,00 – 1,11	< 30	Excelente
11 – 15	1,12 – 1,18	31 – 35	Bom
16 – 25	1,19 – 1,34	36 – 45	Razoável
26 – 31	1,35 – 1,45	46 – 55	Ruim
32 – 37	1,46 – 1,59	56 – 65	Muito ruim
> 38	> 1,60	> 66	Péssimo

4.2.5.7 Determinação do ângulo de repouso estático

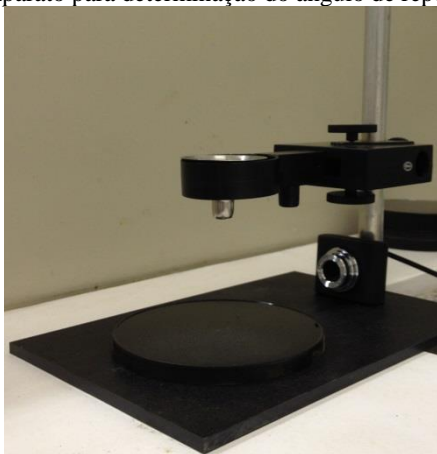
O ângulo de repouso estático foi utilizado também como medida de determinação do fluxo das formulações preparadas, uma vez que esse representa a inclinação limítrofe para escoamento pela superação das forças interparticulares do sistema em função da gravidade (CROWDER; HICKEY, 2000; AULTON; TAYLOR, 2013).

As medições do ângulo de repouso estático (θ) foram realizadas por meio da técnica do funil de altura variável, utilizando aparato de fabricação própria (Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia, UFSC, Brasil), conforme demonstrado na Figura 43. O aparato consiste de uma base de altura variável onde foi fixado um funil de aço

inoxidável (diâmetro superior: 3,4 cm; diâmetro inferior: 0,7 cm; altura: 2,3 cm). A porção inferior do funil foi posicionada a uma altura de 4 cm da base para evitar que a aceleração das partículas em queda livre provocasse o colapso dos cones de repouso. O material a ser analisado foi alimentado no funil até completo preenchimento, correspondendo a um volume total de 8,5 mL, mantendo a parte inferior do funil fechada até completo preenchimento deste. Após preenchido, foi permitido o escoamento do material pelo funil e consequente deposição na base do aparato. Após término do escoamento, imagens foram captadas em fundo negro, utilizando câmera digital fixada paralelamente à base. As imagens foram analisadas utilizando o *software* Size Meter versão 1.1 (LCP, UFSC/CTC/EQA, Brasil), onde a altura e a largura dos cones foram determinadas digitalmente. Todos os experimentos foram realizados em sala fechada com umidade relativa controlada a 15 %. Os resultados foram expressos como a média de seis determinações e comparados aos valores de referência descritos na Tabela 19. O ângulo de repouso (θ) foi então calculado como o inverso da tangente obtida pela equação:

$$Tg\theta = \frac{\text{Altura}}{\text{Raio}} \quad (34)$$

Figura 43. Aparato para determinação do ângulo de repouso estático.



4.2.5.8 Avaliação mecânica dos filmes de revestimento

As características mecânicas dos filmes de revestimento, tais como a força de ruptura, foram avaliadas por meio de texturometria utilizando o texturômetro TA.HD Plus (Stable MicroSystems, Reino Unido), equipado com célula de carga de 300 N (Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC). As análises foram realizadas de acordo com o descrito por Benbettaieb e colaboradores (2015), com breves modificações. Os filmes da superfície dos *pellets* foram extraídos cuidadosamente fazendo uso de um bisturi cirúrgico e duas de suas extremidades foram fixadas em painéis plásticos utilizando cola de cianoacrilato (Loctite, Brasil). Os painéis plásticos foram então fixados à sonda de alongamento do texturômetro e o filme foi esticado uniaxialmente a uma razão de 50 mm/min, até o seu rompimento. Os dados foram coletados e curvas de tensão-deformação foram traçadas para posterior análise e comparação dos resultados.

4.2.5.9 Avaliação da capacidade de desassociação das microesferas da superfície dos *pellets*

Os sistemas desenvolvidos foram avaliados em relação à capacidade de desassociação das microesferas, ou seja, capacidade do sistema carreador em liberar as microesferas em meio aquoso. O ensaio em questão, juntamente com os descritos nas seções 4.2.5.10 e 4.2.5.11, é de suma importância uma vez que demonstra se o sistema é viável como carreador tecnológico das microesfera, sem alterar sua funcionalidade e perfil de liberação.

O ensaio foi realizado em equipamento dissolutor de cilindros recíprocos (Aparato 3 da Farmacopeia Americana) modelo BioDis RRT10 (Erweka, Alemanha). Os sistemas foram dispostos em câmaras com malha de contenção de 50 μm e submetidos à tensão hidrodinâmica a uma velocidade de seis imersões por min em 250 mL de tampão HCl pH 1,2 (BRASIL, 2010) previamente equilibrado a 37 °C. O ensaio foi realizado em seis câmaras, cada uma contendo 500 mg de *pellets* revestidos (equivalente a aproximadamente 14 mg de microesferas) e alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada duas imersões da câmara no meio, totalizando 20 imersões. As alíquotas foram analisadas em câmara K-Cell (Intralab, Brasil) para contagem do número de microesferas em suspensão, de acordo com o descrito na seção 4.2.5.1. Não houve reposição de meio líquido durante o experimento e a quantidade de partículas removida em cada alíquota foi contabilizada na determinação do número cumulativo de partículas. Com base na carga de microesferas

incorporadas, determinou-se a quantidade de microesferas liberadas no meio em função do número de imersões. Os resultados se referem à média aritmética das seis determinações por amostra.

4.2.5.10 Avaliação da capacidade de desagregação das microesferas da superfície dos *pellets*

De forma semelhante ao descrito na seção 4.2.5.9, a capacidade de desagregação das microesferas pós desassociação da superfície dos *pellets* foi investigada fazendo uso do aparato dissolutor de cilindros recíprocos modelo BioDis RRT10 (Erweka, Alemanha). Os *pellets* revestidos foram dispostos em câmaras com malha de contenção de 50 μm e submetidos à tensão hidrodinâmica a uma velocidade de seis imersões por minuto em 250 mL de tampão HCl pH 1,2 (BRASIL, 2010) previamente equilibrado a 37 °C. Em cada câmara, foram dispostos 1 g de *pellets* revestidos (equivalente a cerca de 28 mg de microesferas), uma vez que há necessidade de maior concentração de esferas em suspensão para a análise por espalhamento de luz. Alíquotas de 10 mL foram coletadas a cada duas imersões, num total de 20 imersões ao término da análise. Cada alíquota foi transferida para o módulo de dispersão aquosa do analisador de partículas Mastersizer 2000 (Malvern, Reino Unido) e o perfil granulométrico das partículas em suspensão foi determinado por espalhamento de luz, conforme descrito na seção 4.2.2.1. Não houve reposição de meio líquido durante o experimento, uma vez que a densidade de partículas no meio não influencia significativamente na análise por espalhamento de luz.

Para comparação, avaliou-se também o pó de microesferas, adicionado diretamente na câmara do equipamento dissolutor e processado conforme descrito previamente. Como controle, para garantir que as microesferas não se mantinham retidas na câmara dos cilindros de dissolução, uma massa conhecida de micropartículas foi previamente suspensas no meio e desagregada fazendo uso de irradiação ultrassônica. A suspensão foi adicionada diretamente na câmara e se permitiu que fluísse para o interior da cuba de dissolução.

4.2.5.11 Estudo de liberação do TESO a partir dos sistemas obtidos

Os ensaios de liberação das microesferas, TESO em pó e dos sistemas multiparticulados foram realizados em aparato de dissolução tipo 2 (pás) (BRASIL, 2010) modelo 299 (Nova Ética, Brasil). As análises foram realizadas em triplicata, em tampão fosfato pH 6,8, mantido sob agitação a 75 rpm a 37 °C. Em intervalos previamente

definidos, alíquotas de 5 mL foram coletadas, centrifugadas e analisadas por espectroscopia na região do ultravioleta, para quantificação do extrato total liberado, e por cromatografia líquida de alta eficiência, para quantificação do ácido clorogênico liberado. As amostras quantificadas por espectroscopia UV foram diluídas em hidróxido de sódio 0,5 % (m/v) e analisadas de acordo com o método descrito na seção 4.2.2.3. Não houve reposição do volume de meio removido, uma vez que as microesferas se encontravam homogeneamente dispersas nesse e não era desejável sua diluição. Com base nos resultados, curvas correlacionando o tempo de ensaio e o percentual cumulativo de extrato ou ácido clorogênico liberados foram traçadas.

Os perfis de dissolução obtidos foram comparados com base nos seus respectivos fatores de similaridade (f_2), calculados conforme descrito por Costa (2001). O f_2 reflete equivalência de dois perfis quando seu valor se encontra entre 50 e 100.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistemas nano e microestruturados têm sido vastamente estudados em decorrência da possibilidade de controle da liberação de insumos ativos, além de promoverem maior estabilidade aos compostos incorporados nessas estruturas (PIMENTEL et al., 2007). Por essa razão, um maior foco tem sido dado à obtenção destes sistemas no estado sólido, uma vez que, como sólidos, são potencialmente mais estáveis quando comparados à sua forma dispersa no estado líquido (SHAM et al., 2004). Entretanto, em decorrência do baixo tamanho de partícula, esses sistemas apresentam reduzida capacidade de fluxo, uma vez que são mais susceptíveis às forças interparticulares (CROWDER; HICKEY, 2000). Sendo assim, métodos tradicionais de processamento de sólidos na indústria farmacêutica se tornam dificultosos ou impraticáveis, uma vez que estes fazem uso da capacidade de escoamento do material para processamento por gravidade (AULTON; TAYLOR, 2013). Dessa forma, aos poucos, verifica-se o surgimento de pedidos de proteção intelectual de soluções para contornar esta questão. Em geral, observa-se que existe uma tendência à associação destas micro e nanoestruturas a macroestruturas, que sejam capazes de prover melhor escoabilidade ao material. Dentro dessa ideia, neste capítulo se explora a possibilidade de incorporar microesferas contendo TESO de *C. glaziovii* a *pellets* carreadores utilizando a técnica de leito fluidizado. A estrutura final formada tem como finalidade atuar como carreador

tecnológico, sem interferir significativamente na capacidade de controle de liberação das microesferas.

4.3.1 Preparação e caracterização granulométrica das microesferas de *C. glaziovii*

Como produto modelo para incorporação posterior em *pellets* carreadores, optou-se por trabalhar com microesferas poliméricas de *C. glaziovii* preparadas com PLGA pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente. A escolha desses sistemas foi fundamentada principalmente em decorrência da higroscopicidade que estes extratos vegetais apresentam, fazendo com que as micropartículas preparadas a partir destes sejam susceptíveis às forças de adesão por capilaridade pela adsorção de moléculas de água à sua superfície (CROWDER; HICKEY, 2000). Dessa forma, a incorporação dessas microesferas a *pellets* inertes é interessante por contornar essa questão e potencialmente proteger o insumo ativo da umidade, cuja presença pode levar à degradação por hidrólise, propiciar o crescimento bacteriano e reduzir a escoabilidade (EMERY et al., 2009), resultando em um produto com propriedades tecnológicas precárias e reduzida validade em prateleira.

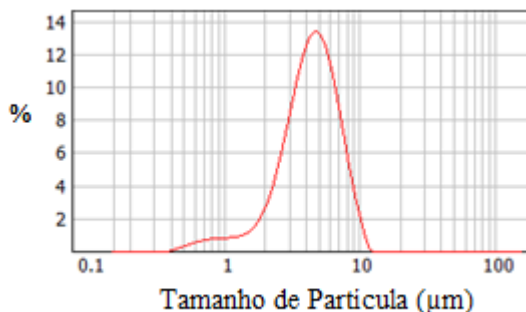
Microesferas contendo extratos de *C. glaziovii*, preparadas pela técnica de dupla emulsão, com tamanhos entre 91 e 220 μm , foram previamente descritas por Dos Santos (2012), visando ao tratamento da pressão arterial. A autora também demonstrou a importância da alteração do balanço de pressão osmótica do sistema durante a preparação, para melhorar a eficiência de encapsulação de extratos vegetais hidrofílicos por essa técnica. Partindo das condições descritas por Dos Santos (2012), nesse trabalho se optou por modificar a técnica, com o objetivo principal de obter microesferas de tamanho muito inferior (cerca de 20 a 50 vezes). Por meio do aumento da velocidade de emulsificação aplicada no sistema, foi possível reduzir sensivelmente o diâmetro médio por volume equivalente obtido para estas partículas, alcançando, dessa forma, as dimensões desejadas para os sistemas modelo nesse trabalho.

As microesferas de *C. glaziovii*, após preparação, foram ressuspensas em água purificada com auxílio de irradiação ultrassônica e avaliadas por espalhamento de luz para determinação de seus parâmetros granulométricos. O diâmetro médio por volume equivalente ($D[4,3]$) obtido para a formulação foi de $4,59 \pm 0,04 \mu\text{m}$. Os índices $D(0,1)$, $D(0,5)$ e $D(0,9)$, que indicam o diâmetro equivalente por volume ao qual 10, 50 e 90 % das partículas são menores, também

foram determinados, resultando em $2,01 \pm 0,01$, $4,29 \pm 0,01$ e $7,48 \pm 0,02$ μm , respectivamente. Em relação ao Span, índice indicativo da polidispersão da amostra, foi obtido valor de $1,25 \pm 0,06$, o qual caracteriza a amostra como monodispersa. A área de superfície específica, também determinada por meio de espalhamento de luz (Equação 29), foi de $1,85 \pm 0,01$ m^2/g . Com base nos parâmetros granulométricos obtidos, é possível afirmar que a formulação alcançou o objetivo traçado, ou seja, um produto pulveréreo com tamanho de partícula inferior a 10 μm , monodisperso e de baixa escoabilidade. Além disso, a formulação preparada apresenta ótimas características para administração por via oral, uma vez que o baixo tamanho de partícula e a elevada área de superfície específica propiciam a interação destas com a mucosa gástrica e, conseqüentemente, maior retenção nas vilosidades (GOTO et al., 2006).

O perfil granulométrico da formulação se encontra disposto na Figura 44 e demonstra claramente a obtenção de uma formulação monodispersa. A pequena cauda ao lado esquerdo da curva granulométrica corresponde a uma porção de partículas nanométricas (< 1 μm), em uma proporção insignificante em relação ao volume total da formulação. Essas partículas, em decorrência de sua baixa proporção, pouco influem no diâmetro médio, conforme demonstrado pelos índices granulométricos descritos acima.

Figura 44. Perfil granulométrico obtido para as microesferas de *C. glaziovii*.



4.3.2 Eficiência de encapsulação e teor de TESO nas microesferas

A preparação de sistemas particulados pela técnica de dupla emulsão para encapsulação de insumos ativos hidrofílicos é desafiadora no que tange à eficiência de encapsulação do fármaco na estrutura da partícula. As substâncias hidrofílicas, por natureza, apresentam forte

tendência a difundir da fase aquosa interna, altamente concentrada, para a fase aquosa externa da emulsão, reduzindo sensivelmente a eficiência de encapsulação (YE et al., 2010; IQBAL et al., 2013). Tal questão foi também evidenciada por Dos Santos (2012), que optou por remediar a questão por meio da adição de cloreto de sódio à fase aquosa externa da dupla emulsão. Dessa forma, altera-se o balanço osmótico da emulsão, uma vez que a fase aquosa externa apresentará uma pressão osmótica mais elevada quando comparada à fase aquosa interna, minimizando a difusão do insumo ativo para o meio externo das gotículas da emulsão, anteriormente à solidificação da partícula. Como resultado, a autora alcançou melhores valores de eficiência de encapsulação. Além disso, a adição do cloreto de sódio também acarretou na redução da porosidade, influenciando sensivelmente no perfil de liberação do extrato incorporado, por inibir a difusão do extrato da partícula para o meio aquoso.

De forma similar, no presente trabalho, visando obter uma eficiência de encapsulação adequada ao desenvolvimento de um sistema microestruturado, a formulação foi preparada empregando o cloreto de sódio como agente osmótico na fase aquosa externa da dupla emulsão. Os valores de eficiência de encapsulação e teor de TESO na partícula foram determinados de forma direta, por meio da solubilização das partículas, em diclorometano, e extração líquido-líquido do extrato. A porção aquosa da extração foi analisada por espectroscopia no ultravioleta.

O método empregado para quantificação apresentou linearidade na faixa de concentração de 1 a 200 µg/mL de TESO em hidróxido de sódio 0,5 % (m/v), com coeficiente de correlação da reta de 0,9999 ($y = 0,009x + 0,029$). Os limites de detecção e quantificação foram determinados como 0,002 e 0,006 µg/mL, respectivamente, indicando que pequenas quantidades do analito são detectáveis e quantificáveis por esse método. Em relação à precisão, avaliada pela repetibilidade e pela precisão intermediária, foram observados valores coerentes, acima de 99,4 % para todas as análises, com desvios padrão relativos inferiores a 5 %. Para a exatidão, avaliada como indicativo da concordância entre os valores experimentais e os valores reais, em todos os tratamentos foram obtidos valores de recuperação próximos a 100 %, não ultrapassando a faixa de 99,8 a 101,2 %. Dessa forma, o método espectroscópico se apresentou adequado para a quantificação do TESO em soluções alcalinas após extração líquido-líquido.

Por fim, após extração e quantificação do TESO incorporado na partícula, determinou-se que a eficiência de encapsulação do método foi

de $10,8 \pm 0,1$ %. Em relação ao teor, as partículas apresentaram valor de $6,5 \pm 0,1$ % (m/m).

O valor de eficiência de encapsulação, embora aparentemente baixo, é considerado adequado, levando em consideração as características de solubilidade do extrato e o método de encapsulação empregado. Ao comparar o valor com aqueles obtidos por Dos Santos (2012), é possível notar que a eficiência de encapsulação desse método é significativamente inferior aos valores descritos pela autora (20 - 42 %). Entretanto, tal discrepância se justifica pela diferença dos tamanhos de partícula nos dois sistemas. Nesse trabalho, a emulsão é submetida à alta homogeneização e gotículas de tamanho muito reduzido são obtidas. Devido à área de superfície do sistema ser muito mais elevada, a difusão do extrato vegetal da fase aquosa interna para a externa é facilitada, mesmo com a adição de agente osmótico. Vale ressaltar que, mesmo assim, os valores obtidos para a eficiência de encapsulação são considerados interessantes (GIRI et al., 2013), levando em consideração as condições experimentais da preparação da formulação. Dessa forma, sugere-se que o emprego do agente osmótico desempenhou um papel bastante importante na obtenção deste valor (dados não demonstrados).

4.3.3 Fracionamento dos *pellets* inertes

O processo de associação das microesferas aos *pellets* foi executado fazendo uso de *pellets* disponíveis comercialmente. Para tal, iniciou-se com o fracionamento da matéria-prima, a fim de se obter uma fração granulométrica mais monodispersa. O perfil granulométrico do material é de suma importância, uma vez que a associação das microesferas aos *pellets* foi realizada por meio de técnica de revestimento pelicular. No revestimento pelicular de formas multiparticuladas, o emprego de um material monodisperso auxilia na obtenção de revestimentos homogêneos, tanto em questão de superfície efetivamente revestida quanto em espessura de revestimento (MCGINITY; FELTON, 2008). A partir da matéria-prima disponível, separou-se por tamisação a fração no intervalo de 850 a 1000 μm , cujo rendimento foi de 74 %, indicando uma quantidade majoritária da matéria-prima na faixa granulométrica de interesse.

A fração útil dos *pellets* foi caracterizada por espalhamento de luz e se verificou valor de diâmetro médio por volume equivalente ($D[4,3]$) de $1201,1 \pm 0,1$ μm , com índice de polidispersão (span) de 0,569. O valor do $D[4,3]$ superior ao limite máximo da fração separada é em decorrência dos diferentes princípios de medição das duas técnicas, não se podendo comparar os resultados.

A técnica de espalhamento de luz determina o diâmetro de área projetada (*projected area diameter*) e, por meio de cálculos computacionais, expressa o resultado como diâmetro por volume equivalente (TINKE et al., 2008). Ou seja, o resultado expresso é o diâmetro de uma esfera perfeita com o mesmo volume que a partícula analisada. Como a calibração da matéria-prima foi realizada fazendo uso de tamisação, a passagem de uma partícula pela malha do tamis ocorrerá sempre que qualquer diâmetro da partícula for menor que o espaçamento da malha de retenção. Como os *pellets* não são esferas perfeitas, são esperados valores de $D[4,3]$ mais elevados. Entretanto, a informação mais importante nesta análise é o valor de span, que claramente indica que o fracionamento deu origem a um material bastante monodisperso ($\text{Span} = 0,569$), adequado para a utilização em estudos de revestimento. A matéria-prima prévia ao fracionamento apresentou valor de Span médio de 0,983, indicando se tratar de um material relativamente polidisperso, ao comparar com o material fracionado.

4.3.4 Estudos de associação das microesferas aos *pellets*

A associação das microesferas à superfície dos *pellets* foi investigada por meio da técnica de revestimento pelicular em leito fluidizado. Para tal, foram selecionados dois polímeros com características interessantes para o estudo: PVP-PVAc e PVA-PEG-PVA. Ambos os polímeros são altamente hidrossolúveis, capazes de formar filme e já são empregados na indústria farmacêutica, em especial na preparação de formas farmacêuticas sólidas. A escolha desses foi baseada principalmente na sua solubilidade, uma vez que a proposta é garantir a aderência das microesferas à superfície dos *pellets* pela formação de filmes poliméricos, mas não reter estas partículas ao entrar em contato com o meio líquido após administração por via oral.

O revestimento pelicular foi executado em leito fluidizado tipo *top spray*. Todos os parâmetros operacionais do leito fluidizado, tais como fluxo de ar de entrada, temperatura e pressão do sistema de atomização, foram padronizados previamente, visando reduzir a variabilidade experimental. Os fatores avaliados neste estudo foram (A) tipo de polímero, (B) concentração do polímero e (C) proporção de suspensão de revestimento por massa de *pellets*. Às soluções de polímero, foram adicionadas microesferas na concentração de 5 mg/mL e 0,01 % (m/v) de azul de metileno. A adição do azul de metileno visou garantir visibilidade à camada de revestimento, facilitando a análise da superfície efetivamente revestida.

Para avaliação da superfície revestida, propôs-se o uso de uma técnica de análise RGB de imagem. Essa técnica difere de outras consagradas na análise de revestimento, tais como a perfilometria e a microscopia eletrônica de varredura com espectrometria de energia dispersiva de raios-X, mais caras e de difícil acesso. Embora nunca tenha sido empregada para análise de revestimentos, essa técnica foi utilizada com surpreendente sucesso para análise de produtos alimentícios, permitindo a predição do conteúdo de substâncias cromogênicas nestas amostras (FOCA et al., 2011).

De forma semelhante, a técnica se mostrou bastante viável para a análise dos sistemas revestidos propostos neste trabalho. As respostas obtidas para a porcentagem de superfície efetivamente revestida em função dos fatores A, B e C se encontram descritas na Tabela 20.

Tabela 20. Respostas obtidas para a superfície revestida no planejamento fatorial IV-*Optimal*.

#	Fatores			Superfície revestida (%; m/m)
	Tipo de polímero	Concentração de polímero (%; m/m)	Revestimento por <i>pellets</i> (mL por g)	
1	PVP-PVAc	2,5	1:1	26,3
2	PVP-PVAc	2,5	2:1	65,4
3	PVP-PVAc	1,0	1:1	26,8
4	PVP-PVAc	5,0	3:1	82,9
5	PVA-PEG-PVA	2,5	2:1	86,9
6	PVA-PEG-PVA	2,5	1:1	30,3
7	PVP-PVAc	5,0	1:1	20,0
8	PVA-PEG-PVA	5,0	1:1	26,1
9	PVP-PVAc	2,5	2:1	63,1
10	PVA-PEG-PVA	5,0	2:1	55,7
11	PVA-PEG-PVA	2,5	2:1	85,2
12	PVA-PEG-PVA	1,0	2:1	88,2
13	PVP-PVAc	1,0	3:1	93,3
14	PVP-PVAc	5,0	2:1	51,2
15	PVA-PEG-PVA	1,0	3:1	99,1
16	PVA-PEG-PVA	2,5	3:1	90,1
17	PVP-PVAc	1,0	2:1	90,7
18	PVA-PEG-PVA	1,0	1:1	27,9
19	PVA-PEG-PVA	5,0	3:1	91,0
20	PVP-PVAc	2,5	3:1	74,7

Dentro do domínio experimental avaliado, foi possível obter valores de superfície revestida na faixa de 20,0 a 99,1 %, indicando que o domínio experimental cobriu toda a região desejada para o experimento. Ao analisar esta resposta por ANOVA, é possível perceber que todos os fatores e algumas de suas interações apresentaram relevância na resposta. São eles os fatores A (tipo de polímero; $p = 0,0014$, coeficiente = -3,91), B (concentração do polímero; $p = 0,0004$, coeficientes = 8,50/-0,52) e C (proporção da suspensão de revestimento por massa de *pellets*; $p < 0,0001$, coeficiente = -36,24/10,21), e as interações AB ($p = 0,0282$) e BC ($p = 0,0023$). Os fatores B e C apresentam dois coeficientes, um para cada nível do fator categórico A. As interações AB e BC apresentam diferentes coeficientes, de acordo com a combinação de fatores, conforme demonstrado na Equação 35.

O modelo matemático desenhado para essa resposta apresentou relevância estatística ($p < 0,0001$) e o intercepto foi de 62,49. O *lack of fit* não foi relevante. A equação matemática que rege esse modelo, em função dos termos codificados, é:

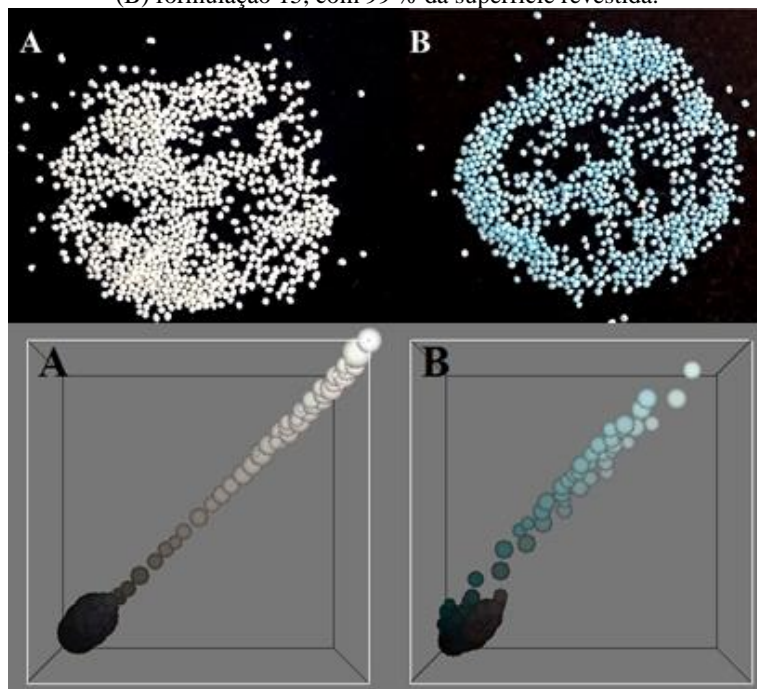
$$\begin{aligned} \text{Superfície revestida (\%)} = & 62,49 - 3,91 * A + 8,50 * B[1] - \\ & 0,52 * B[2] - 36,24 * C[1] + 10,21 * C[2] + 3,18 * AB[1] - 3,97 * \\ & AB[2] - 7,39 * B[1]C[1] + 2,58 * B[2]C[1] + 8,24 * B[1]C[2] + \\ & 3,02 * B[2]C[2] \end{aligned} \quad (35)$$

O modelo matemático apresentou excelentes coeficientes de correlação R^2 (0,9914), R^2 ajustado (0,9795) e R^2 preditivo (0,9484), validando o modelo como ferramenta preditiva para otimização.

Por meio da análise de imagem RGB foi possível determinar a superfície efetivamente recoberta pela suspensão de revestimento, uma vez que esta é colorida, em contraste à coloração branca dos *pellets* inertes. A técnica se mostrou interessante para a triagem de formulações que envolvam revestimento, já que é de fácil execução e baixo custo. Para cada formulação, fotos foram tiradas, sob luminosidade controlada, e analisadas digitalmente. Para cada pixel da imagem, foi determinado o tom RGB e, para cada tom, a sua respectiva frequência. Por meio de comparação do perfil de tons RGB das formulações revestidas e dos *pellets* inertes, determinou-se a porcentagem de superfície revestida. A Figura 45 demonstra os histogramas de cor dos *pellets* inertes e da formulação 15, cuja área de superfície total revestida é de cerca de 99 %. Os histogramas de cor são gráficos em três dimensões, que correlacionam os códigos RGB (eixos x, y e z se referem,

respectivamente, ao vermelho, verde e azul). A frequência dos tons é expressa em função do tamanho dos domínios esféricos de cada tom. Em todas as imagens, uma grande frequência de tons pretos (0, 0, 0) foi notada, a qual se refere ao fundo das imagens (Figura 45). Por essa razão, esses tons foram excluídos, uma vez que não representam parte da superfície dos *pellets*.

Figura 45. Histogramas de cor RGB para (A) *pellets* inertes sem revestimento e (B) formulação 15, com 99 % da superfície revestida.



Em geral, observaram-se valores de superfície revestida levemente superiores para o PVA-PEG-PVA quando comparado ao PVP-PVAc (Figura 46). Conforme evidenciado pelo coeficiente negativo do fator A, ocorre uma redução na superfície total revestida ao trocar o polímero de revestimento PVA-PEG-PVA (codificado como nível menor, ou seja, -1) por PVP-PVAc (codificado como nível maior, ou seja, +1), caso todas as outras condições se mantenham iguais. Esse efeito pode estar associado à viscosidade das soluções destes polímeros. Embora ambos os polímeros formem soluções de baixa viscosidade em concentrações de até 10 %, o PVP-PVAc é levemente mais viscoso, o

que pode impactar negativamente no processo de revestimento pelicular (TEUNOU; PONCELET, 2002). O PVP-PVAc apresenta viscosidade (1 % em água) de aproximadamente 4 mPas, enquanto o PVA-PEG-PVA apresenta viscosidade inferior a 1 mPas.

Um polímero de revestimento de alta viscosidade pode acarretar em dificuldade de processamento por fluir mais vagarosamente nas cânulas do sistema do leito fluidizado (TEUNOU; PONCELET, 2002). Além disso, as gotículas formadas na atomização da solução de revestimento tendem a um tamanho maior em decorrência da maior viscosidade, assim apresentam maior dificuldade em recobrir homogeneamente o material a ser revestido (HEDE et al., 2007; 2008).

O mesmo efeito resultante da viscosidade da suspensão de revestimento pode ser verificado no fator B (concentração do polímero). Evidentemente, à medida que se aumenta a concentração do polímero solubilizado, aumenta-se a viscosidade aparente da solução. Ao empregar uma proporção de três partes de suspensão de revestimento e uma parte de *pellets*, o efeito da concentração do polímero é praticamente nulo (Figura 46) uma vez que o volume da suspensão de revestimento é grande o suficiente para prover a cobertura de toda a área superficial dos *pellets*. Entretanto, ao reduzir esta proporção para 2:1 ou 1:1, o efeito da concentração se torna mais importante uma vez que a capacidade das gotículas aspergidas em se espalharem na superfície dos *pellets* é dificultada. No caso da proporção 2:1 (suspensão:*pellets*), verifica-se uma redução muito importante de superfície revestida ao empregar concentração de 1 % de polímero (formulação 15), passando de 99,1 % para 55,7 % quando a concentração do polímero é de 5 % (formulação 10). Esse resultado ressalta a importância das características físico-químicas da suspensão de revestimento na qualidade do produto final obtido durante o revestimento em leito fluidizado. Sendo assim, com base nos dados expostos e nos gráficos de barra (Figura 46), definiu-se que os parâmetros mais adequados para obter revestimentos eficazes e uniformes foram: PVA-PEG-PVA (Kollicoat[®] Protect) na concentração de 1 % (m/m) e proporção 2:1 de suspensão de revestimento por g de *pellets*.

Dentro dessas condições, foram preparados três lotes da formulação utilizando PVA-PEG-PVA na concentração de 1 % (m/m), sem azul de metileno. Cada lote foi revestido com três camadas de revestimento na proporção 2:1 de suspensão de revestimento por g de *pellets*. Como cada lote consistia de 20 g de *pellets*, cada camada era composta de 40 mL da suspensão de revestimento, contendo 200 mg de microesferas dispersas (concentração de 5 mg/mL). Ao final do

processamento, avaliou-se o rendimento da formulação como a proporção entre a massa teórica final (soma da massa de *pellets*, polímero e microesferas incorporadas) e a massa experimental encontrada. O rendimento médio do processo de revestimento foi de $93,7 \pm 1,2$ %, indicando pouquíssima perda de material em função da técnica utilizada durante o processamento.

Figura 46. Gráficos de barra correlacionando a superfície total revestida com a concentração de polímero e proporção entre suspensão de revestimento e massa de *pellets*.

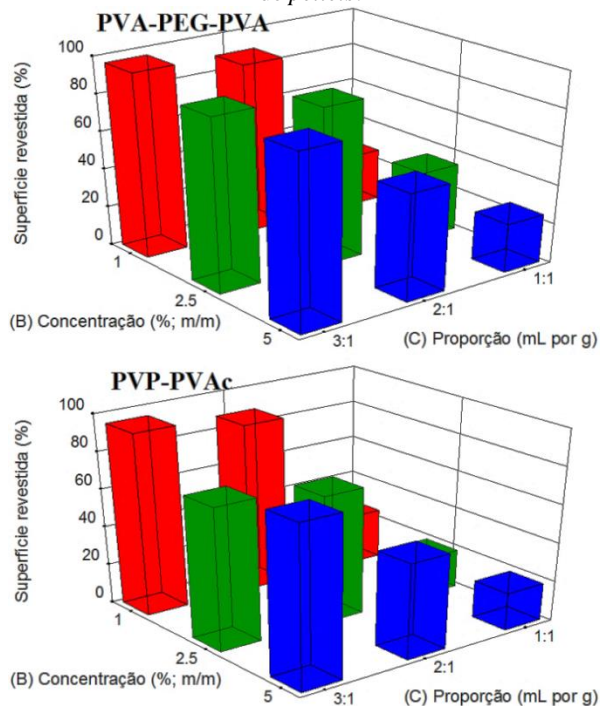


Figura 47. *Pellets* revestidos com microesferas.



No decorrer do processo de revestimento, notou-se que a formulação adquiriu gradativamente uma coloração mais escura, em tom castanho característico do extrato (Figura 47). Tal coloração é a mesma observada nas microesferas e indica que essas estão efetivamente sendo incorporadas à superfície dos *pellets*.

4.3.5 Teor de microesferas associadas aos *pellets*

A operação de revestimento de formas farmacêuticas multiparticuladas apresenta diversas variáveis que podem influenciar a eficácia do revestimento. Nesse trabalho, a superfície de *pellets* inertes foi revestida com microesferas dispersas em uma solução de polímero formador de filme. Entretanto, para determinar o teor de microesferas efetivamente incorporado aos *pellets*, não é possível quantificar simplesmente o TESO incorporado nestas, uma vez que esse pode estar presente livre na solução de revestimento, em decorrência de uma liberação prematura do seu conteúdo no meio polimérico. Portanto, a presença de extrato nos *pellets* não necessariamente indica que as microesferas se encontram aderidas em sua superfície. Face ao exposto, a melhor forma de determinar a quantidade de microesferas efetivamente associadas aos *pellets* é por meio de sua contagem direta.

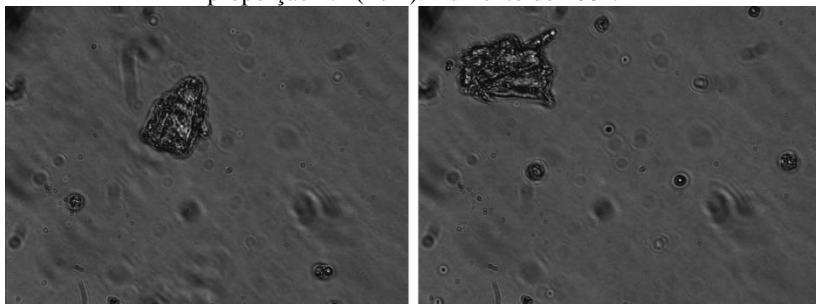
Por se tratar de partículas cujo perfil granulométrico se encontra majoritariamente entre 1 e 10 μm , essas podem ser visualizadas por meio de microscopia de luz. Sendo assim, a contagem das microesferas foi realizada fazendo uso de câmaras comerciais de contagem de partículas. As lâminas utilizadas são constituídas de 10 câmaras cada. Dentro da câmara, o número de partículas é contado em uma área total de nove poços, o que corresponde a um volume de 0,0999 mm^3 . Com base nisso, é possível determinar o número de partículas por mL e, assim, correlacionar com a massa de partículas presente na amostra.

Inicialmente, foi investigada a linearidade do método para quantificação das microesferas. Partindo de suspensões dessas, preparadas com auxílio de irradiação ultrassônica, determinou-se que o método é linear na faixa de 10 a 750 $\mu\text{g/mL}$ de microesferas ($r = 0,9999$; $y = 18076x + 14922$). As curvas analíticas foram traçadas correlacionando a concentração de microesferas (em $\mu\text{g/mL}$, eixo X) com o número de partículas contadas por mL de suspensão (eixo Y). Concentrações inferiores a 10 $\mu\text{g/mL}$ geram uma contagem inferior a 226 partículas/ μL , ou seja, menos de 22 partículas por câmara da lâmina. Já concentrações superiores a 750 $\mu\text{g/mL}$ geram contagens muito elevadas, superiores a 13700 partículas/ μL , ou seja, mais de 1300

partículas por câmara da lâmina. Esse número excessivamente elevado de partículas pode ocasionar erro de contagem, uma vez que essas podem se sobrepor facilmente na câmara, ou até mesmo levar à contagens múltiplas de uma mesma partícula.

Com base nas curvas analíticas preparadas, foram calculados os limites de detecção e quantificação, os quais foram 0,0041 e 0,0125 µg/mL, respectivamente.

Figura 48. Microfotografia das microesferas em suspensão com partículas de celulose microcristalina 101 (esquerda) e *pellets* inertes triturados (direita) em proporção 1:1 (m/m). Aumento de 400x.



O método também demonstrou exatidão na quantificação de microesferas, mesmo em presença de agentes contaminantes esperados, como partículas de celulose microcristalina e de *pellets* triturados. Em ambos os casos, porcentagens de recuperação entre 99,8 e 101,1 % foram obtidas. A diferenciação entre as microesferas e estes agentes contaminantes, na contagem visual por microscopia de luz, na prática, não foi um problema. Conforme é possível verificar na Figura 48, as microesferas apresentam formato esférico praticamente perfeito e o uso do micrométrico permite identificar os diferentes níveis da esfera em função do foco. Já as partículas de celulose microcristalina apresentam formato irregular e são muito maiores quando comparadas às microesferas (Figura 48, esquerda). As partículas de *pellets* triturados apresentam características similares àquelas observadas para as partículas de celulose microcristalina (Figura 48, direita).

Por fim, o método foi utilizado para quantificar o número e massa de microesferas efetivamente associadas aos pellets. Foram contadas $533.008.989 \pm 19.352.057$ (DPR = 3,6 %) partículas por g de *pellets*. Esse número de microesferas corresponde a um teor de $28,07 \pm 1,01$ mg de microesferas por g de *pellets*.

Com base nesse teor, é possível determinar o rendimento da associação das microesferas aos *pellets*, levando em consideração a massa total de microesferas adicionada à formulação. O rendimento médio foi de $95,6 \pm 3,4$ %, valor esse em concordância com o rendimento observado para o processo de revestimento, conforme descrito anteriormente. Ressalta-se aqui que tal rendimento de incorporação é bastante elevado, levando em consideração a possibilidade de perda de microesferas no processo de revestimento, e também pela própria friabilidade do produto final após secagem. Tal valor indica que o processo adotado é robusto e permite a incorporação de grandes quantidades de microesferas sem perda significativa de massa dessas.

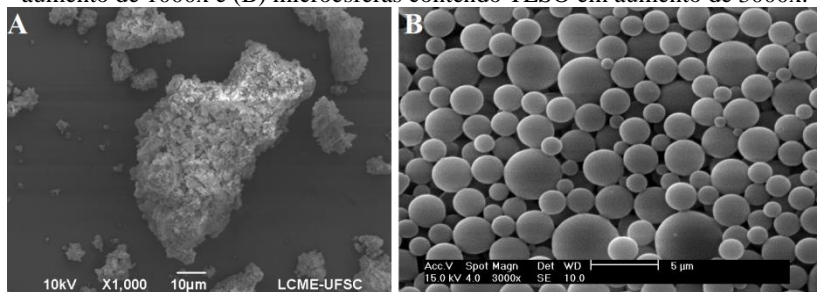
4.3.6 Caracterização micromorfológica dos sistemas obtidos

A caracterização micromorfológica dos sistemas obtidos foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de epifluorescência.

Ao avaliar o TESO de *C. glaziovii* por MEV, verificou-se que o material pulveréneo se trata de partículas altamente irregulares, com grande dispersão granulométrica (Figura 49A). As características morfológicas observadas para esse pó são esperadas, uma vez que o método empregado na secagem do extrato foi a liofilização, o qual apresenta forte tendência à formação de partículas com características irregulares.

O TESO também foi avaliado por microscopia de epifluorescência (Figura 50, linha superior). Verificou-se que as partículas do extrato apresentam forte fluorescência no filtro vermelho. A fluorescência observada pode ocorrer em decorrência do alto teor de compostos fenólicos presentes no extrato, os quais, em decorrência de suas estruturas químicas, podem apresentar fluorescência (LÓPEZ et al., 2003). Além disso, por ser preparado com alto teor etanólico, o TESO possivelmente apresenta elevado teor de clorofila, componente altamente fluorescente (OSÓRIO et al., 2014). Independente da origem da fluorescência observada, considerou-se tal característica vantajosa, por permitir a avaliação das microesferas pela técnica de epifluorescência, uma vez que as mesmas também apresentaram fluorescência oriunda do extrato encapsulado.

Figura 49. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para (A) TESO em aumento de 1000x e (B) microesferas contendo TESO em aumento de 3000x.



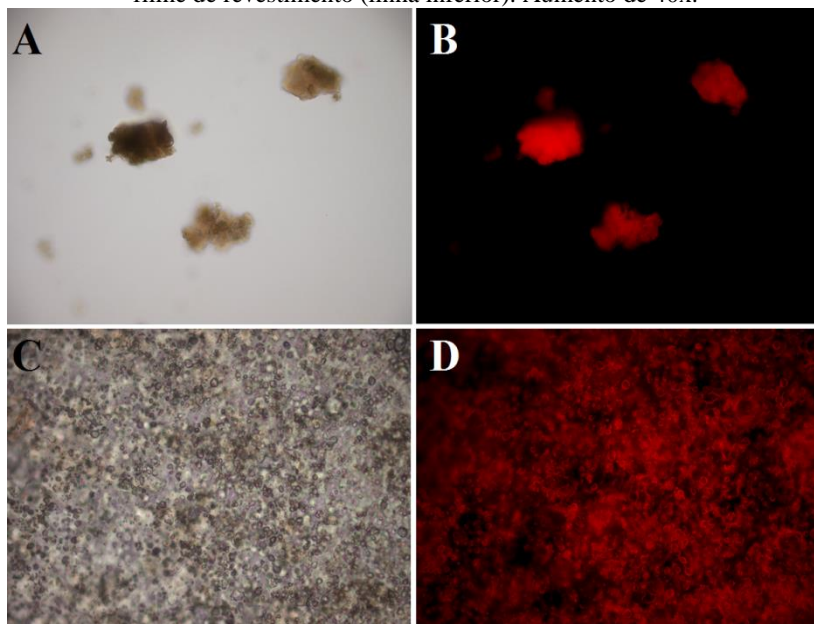
Ao analisar as microesferas contendo TESO (Figura 49B), foi possível observar a formação de esferas de superfície lisa e uniforme, com dispersão de tamanho relativamente homogênea e diâmetro aproximado condizente com os dados apresentados na caracterização granulométrica por espalhamento de luz. Destaca-se aqui o fato dessas partículas apresentarem pouquíssima porosidade.

Em geral, microesferas preparadas pela técnica de dupla emulsão para encapsulação de insumos ativos hidrofílicos usualmente apresentam relativa porosidade. Tal efeito é oriundo da difusão do insumo ativo da fase aquosa interna para a externa, em decorrência do gradiente osmótico entre essas fases. Esse processo leva à formação de canais estruturais que se solidificam em forma de poros à medida que o solvente orgânico é evaporado (FREITAS et al., 2005). Face ao exposto, a baixa porosidade das partículas pode ser em decorrência da adição de cloreto de sódio na fase aquosa externa, o que inibiu a difusão exacerbada do TESO da fase aquosa interna, minimizando a porosidade das partículas. Tal efeito também foi observado por Dos Santos (2012), que notou uma significativa redução na porosidade de microesferas de PLGA, após a adição de agentes osmóticos na fase aquosa externa durante a preparação das formulações.

O filme de revestimento também foi avaliado por microscopia de epifluorescência. Os *pellets* revestidos tiveram sua superfície cuidadosamente raspada utilizando um bisturi cirúrgico e o filme obtido foi analisado entre lâmina e lamínula. Conforme é possível perceber, a Figura 50C demonstra a grande densidade ótica da amostra, uma vez que é possível verificar grandes aglomerados de microesferas nos filmes. Ao avaliar o mesmo campo em fluorescência (Figura 50D), observou-se mais claramente o formato das microesferas presentes na amostra. Aparentemente, as partículas se encontram dispersas

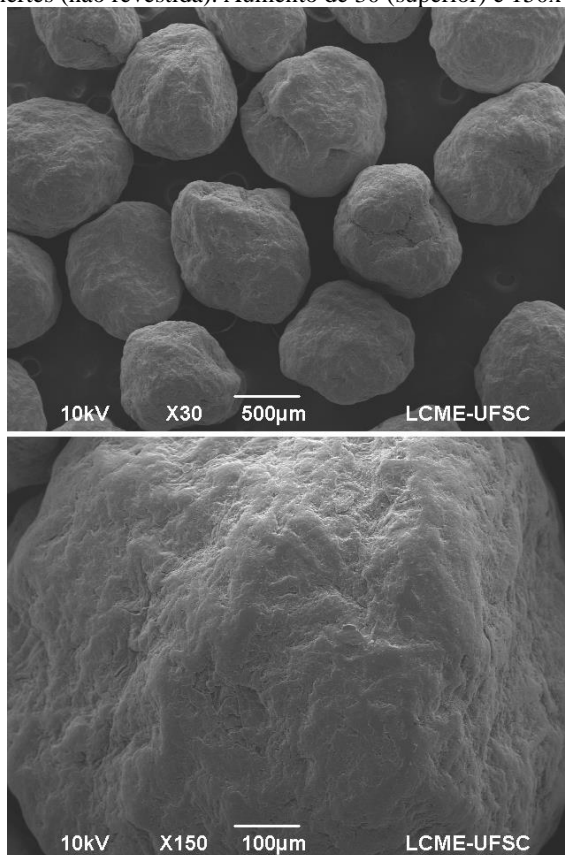
homogeneamente sem formação de agregados. É possível notar pequenas “nuvens” de fluorescência na amostra, as quais podem ser decorrentes da maior densidade óptica da amostra em algumas regiões, ou até mesmo pela liberação prematura do TESO das microesferas durante o revestimento. O extrato, possivelmente liberado das esferas nesta etapa, solidifica-se junto ao filme polimérico e pode causar o efeito observado nas imagens de epifluorescência.

Figura 50. Micrografias obtidas em microscopia de luz em campo claro (A e C) e microscopia de epifluorescência (B e D) para o TESO (linha superior) e o filme de revestimento (linha inferior). Aumento de 40x.



Ao avaliar os *pellets* por MEV, é possível notar que esses apresentam uma superfície levemente rugosa e formato esférico assimétrico (Figura 51). Tais características são típicas de *pellets* preparados com celulose microcristalina como seu maior constituinte.

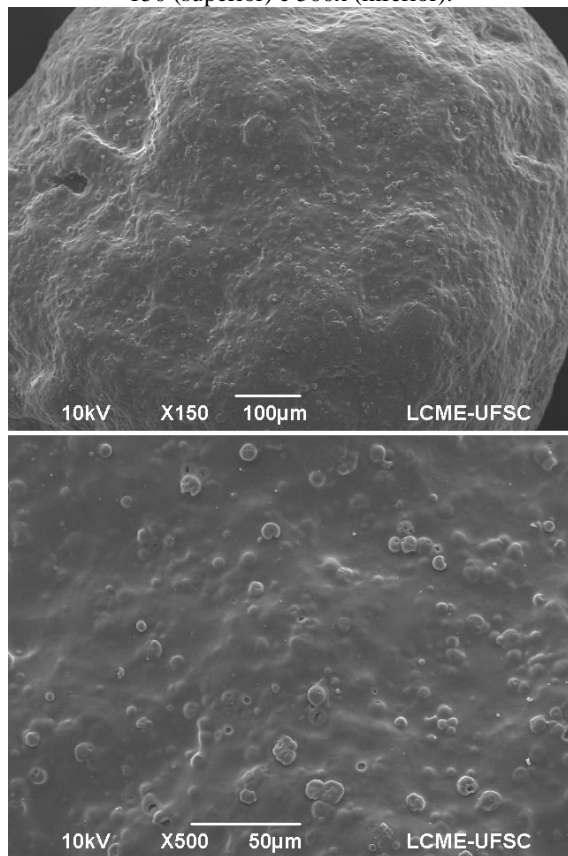
Figura 51. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para a fração útil dos *pellets* inertes (não revestida). Aumento de 30 (superior) e 150x (inferior).



Por sua vez, a avaliação dos *pellets* revestidos com microesferas revela uma estrutura bastante interessante. Os *pellets* apresentam superfície mais lisa em decorrência do filme polimérico formado. Intercalado no filme, é possível perceber a presença das microesferas, que formam uma estrutura semelhante a pequenas saliências (Figura 52). Ao aumentar a magnificação na superfície dos *pellets* revestidos, é possível notar claramente a presença das microesferas em diferentes níveis da camada polimérica (Figura 52, linha inferior). Percebe-se também que as microesferas estão dispersas homoganeamente no filme, não apresentando aglomeração. A visualização dessa estrutura por MEV

confirma a presença das microesferas, conforme verificado previamente por meio da contagem destas em microscopia de luz.

Figura 52. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para os *pellets* associados às microesferas por revestimento em leito fluidizado. Aumento de 150 (superior) e 500x (inferior).

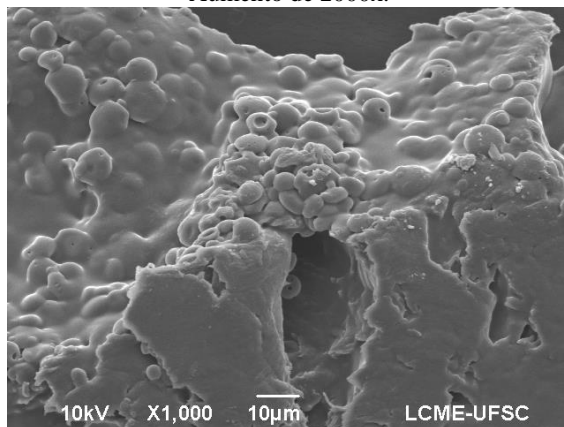


Os *pellets* revestidos foram seccionados transversalmente e a sua estrutura interna analisada tanto por MEV, quanto por microscopia de epifluorescência. Em ambos os casos, a análise foi bastante dificultosa, uma vez que o filme polimérico, em decorrência de sua alta solubilidade, apresentou tendência a se dissolver no meio de congelamento utilizando para realização dos cortes transversais em micrótomo criostato. A Figura 53 demonstra, em sua porção inferior, o

núcleo de celulose microcristalina dos *pellets*, sobreposto de uma camada polimérica impregnada de microesferas contendo TESO.

Figura 53. Micrografia eletrônica de varredura obtida para os *pellets* associados às microesferas por revestimento em leito fluidizado após secção transversal.

Aumento de 2000x.

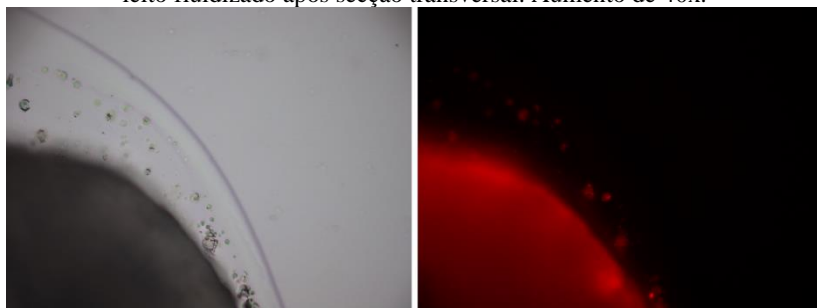


Os cortes transversais também foram avaliados por microscopia de epifluorescência e a mesma estrutura foi observada. Conforme demonstrado na Figura 54, é possível notar que o núcleo de celulose microcristalina apresenta densidade ótica muito alta e, portanto, não permite a passagem de luz no microscópio. Em decorrência desse efeito, o mesmo aparece como fluorescente, embora essa não seja uma fluorescência intrínseca da amostra, mas sim em decorrência da densidade ótica do núcleo inerte.

A micrografia obtida em microscopia de luz em campo claro (Figura 54, esquerda) indica a formação de um filme polimérico bem delimitado em volta do núcleo de celulose microcristalina. Dentro dessa estrutura, observam-se diversas partículas dispersas. A identidade dessas partículas é confirmada ao avaliar o mesmo campo em microscopia de epifluorescência, indicando que se tratam realmente das microesferas contendo TESO. Assim como na micrografia do filme de revestimento (Figura 50D), aqui se observa a formação de uma pequena região fluorescente esfumada dentro do filme polimérico. Diferente do caso da micrografia da figura 50, este corte transversal é bastante fino (5 µm de espessura) e, portanto, pequenas são as chances deste efeito ser decorrente de uma elevada densidade ótica do filme polimérico. Desta forma, aumentam as suspeitas de se tratar de extrato vegetal que foi

liberado das microesferas prematuramente no processo de revestimento. Essa liberação pode ter ocorrido em decorrência da suspensão de revestimento ser mantida em agitação durante o processo de atomização, o que propicia a liberação do extrato vegetal presente nas porções mais externas da microesfera.

Figura 54. Micrografias obtidas em microscopia de luz em campo claro e de epifluorescência para os *pellets* associados às microesferas por revestimento em leito fluidizado após secção transversal. Aumento de 40x.



4.3.7 Avaliação das densidades e propriedades de fluxo dos produtos obtidos

A incorporação das microesferas aos *pellets* inertes tem como objetivo principal a melhora das propriedades mecânicas do produto. A melhora da capacidade de escoamento do material microestruturado permite que este seja empregado em linhas de produção industrial que são dependentes da gravidade. Dessa forma, procura-se conseguir um produto que seja viável para a obtenção de formas farmacêuticas finais por meio da compressão ou encapsulação.

Avaliaram-se as densidades real, aparente e de compactação para, assim, determinar os índices de Hausner e Carr. Esses índices são tipicamente utilizados como indicativo da capacidade de escoamento de um produto particulado (CARR, 1965; CROWDER; HICKEY, 2000). Para tal, parte-se do princípio de que a capacidade de escoamento está diretamente ligada às forças interparticulares que agem no sistema particulado. Quanto maiores essas forças, maior será a diferença entre as densidades aparente e de compactação uma vez que, ao submeter o material ao processo de compactação, maior será o volume compactado pela redução do espaço entre as partículas. Em decorrência disso, ambos os índices levam em consideração a diferença entre essas duas densidades e assim presumem, com relativa confiabilidade, o

comportamento do sistema no que tange ao seu fluxo. Os resultados para todos esses os parâmetros se encontram descritos na Tabela 21.

Tabela 21. Respostas obtidas para as avaliações dos parâmetros mecânicos dos produtos obtidos.

Parâmetro	Material analisado			
	TESO	Microesferas	<i>Pellets</i> inertes	<i>Pellets</i> + Microesferas
Densidade aparente (g/cm ³)	0,31 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,69 ± 0,02	0,74 ± 0,03
Densidade de Compactação (g/cm ³)	0,40 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,78 ± 0,02
Densidade real (g/cm ³)	1,564 ± 0,002	1,461 ± 0,001	1,499 ± 0,001	1,571 ± 0,005
Índice de Hausner	1,27 ± 0,02	1,81 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,03 ± 0,01
Índice de Carr (%)	21,0 ± 1,4	44,7 ± 0,2	5,3 ± 1,0	11,8 ± 0,8
Ângulo de repouso (°)	37,8 ± 1,4	48,4 ± 1,3	20,9 ± 0,6	14,5 ± 0,3
Índice de Esfericidade	-	-	0,83 ± 0,11	0,88 ± 0,08

Ao analisar a densidade aparente dos produtos, é possível notar que o TESO e as microesferas apresentam densidades relativamente baixas. A incorporação do TESO em microesferas levou à redução da densidade aparente cerca de três vezes ($p < 0,0001$), levando à formação de um produto de densidade aparente extremamente baixa. Quanto menor a densidade aparente, maior será o volume ocupado por esse material ao ser encapsulado/comprimido, reduzindo a dose que pode ser efetivamente incorporada em cada unidade de cápsula ou comprimido. Em relação à densidade aparente dos *pellets* inertes e revestidos com microesferas, não houve diferença estatisticamente relevante.

Ao avaliar a densidade real, é possível notar que o pó do TESO apresenta um esqueleto sólido mais denso quando comparado à sua forma encapsulada. A incorporação das microesferas aos *pellets* acarretou no aumento da densidade esquelética desse material.

Em relação à densidade de compactação, é possível notar que os valores obtidos para o TESO e para as microesferas aumentaram

bastante e sua diferença é estatisticamente relevante em relação à sua densidade aparente ($p < 0,0001$). Em relação ao TESO, observa-se um aumento de cerca de 30 % na densidade após compactação. Já para as microesferas se observa um acréscimo de quase 90 %, indicando uma grande diferença entre a densidade aparente e de compactação para esse produto. Tal diferença, vale destacar, indica que o pó de microesferas é sujeito a uma grande quantidade de forças interparticulares, que mantém as partículas afastadas umas das outras no estado de repouso. Essa questão é justificada pelas características morfológicas de cada sistema, uma vez que o TESO é formado majoritariamente por partículas de tamanho muito maior quando comparado à formulação de microesferas (Figura 49).

Quanto às densidades de compactação dos *pellets* inertes e dos *pellets* associados às microesferas, não existe diferença estatística relevante entre ambos. Entretanto, para os *pellets* inertes, observa-se um incremento relevante entre sua densidade aparente e de compactação. Tal efeito pode ser decorrente do formato irregular que estas partículas apresentam, conforme demonstrado pelo seu índice de esfericidade de $0,83 \pm 0,11$. Essa irregularidade pode ocasionar dificuldade de empacotamento dos *pellets* na proveta para medição da densidade aparente. Entretanto, após o processo de compactação, essas partículas se acomodam melhor e a densidade de compactação aumenta. No caso dos *pellets* associados às microesferas, tal efeito não foi observado, provavelmente em decorrência do seu formato mais esférico, facilitando a sua acomodação na proveta para determinação da densidade aparente. O índice de esfericidade para os *pellets* associados às microesferas apresentou melhora em relação aos *pellets* inertes ($p = 0,0001$), em decorrência da formação de película polimérica na superfície do granulado, o que promove consequentemente o arredondamento da partícula.

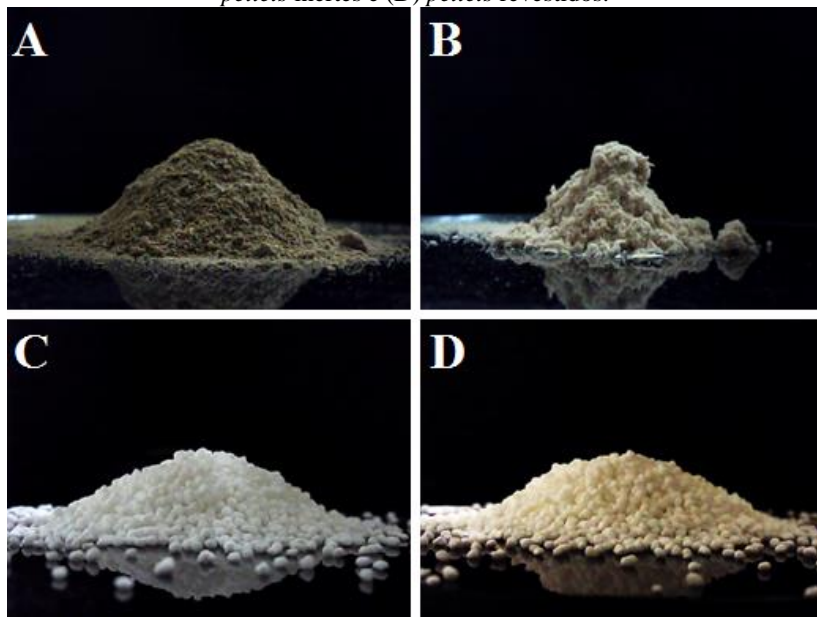
No que tange aos índices de Hausner e de Carr, o comportamento observado está condizente com o observado para as densidades aparentes e de compactação, uma vez que esses índices são um reflexo do comportamento do material em relação às densidades.

O TESO apresentou índices de Hausner de $1,27 \pm 0,02$ e de Carr de $21,0 \pm 1,4$ %. Além disso, ao observar o ângulo de repouso deste material (Figura 55), nota-se um valor elevado de $37,8 \pm 1,4$ °. Todos os parâmetros observados indicam que o extrato vegetal no estado seco apresenta um comportamento de fluxo razoável.

Já em relação às microesferas, essas apresentaram índices de Hausner de $1,81 \pm 0,01$ e de Carr de $44,7 \pm 0,2$ % e o ângulo de repouso

desse material foi extremamente alto ($48,4 \pm 1,3^\circ$). Todos esses parâmetros indicam que as microesferas, no estado sólido, apresentam um comportamento de fluxo de muito ruim a péssimo. Dessa forma, esse material não apresenta comportamento mecânico compatível com a preparação de formas farmacêuticas sólidas. As microesferas apresentaram uma capacidade de escoamento bastante inferior ao TESO em decorrência do seu tamanho. Embora sua forma seja esférica, o que é benéfico ao fluxo, o efeito do tamanho reduzido se sobressai, intensificando a coesão particular e dificultando o escoamento. Ao avaliar o cone de repouso formado pelas microesferas (Figura 55B), nota-se que a dificuldade de escoamento do material é tão exacerbada que um cone assimétrico é formado.

Figura 55. Cones de repouso formados pelo (A) TESO, (B) microesferas, (C) *pellets* inertes e (D) *pellets* revestidos.



Os *pellets* inertes, por si, apresentaram excelentes índices de Hausner ($1,05 \pm 0,01$) e de Carr ($5,3 \pm 1,0\%$) e baixo ângulo de repouso ($20,9 \pm 0,6^\circ$). Esse material granular apresentou ótimas propriedades de escoamento, conforme demonstrado pelo seu cone de repouso (Figura 55). Tal comportamento é esperado, uma vez que esse material granular apresenta um tamanho de partícula médio bastante elevado, fazendo

com que as forças interparticulares que agem no sistema sejam irrisórias em comparação à força gravitacional que incide nas partículas.

A mesma capacidade excelente de escoamento dos *pellets* foi mantida após a associação das microesferas à sua superfície. A formulação revestida apresentou índices de Hausner ($1,03 \pm 0,01$) e de Carr ($11,8 \pm 0,8 \%$) e ângulo de repouso ($14,5 \pm 0,03^\circ$) bastante adequados. Nota-se também que o ângulo de repouso para a formulação revestida foi menor quando comparado aos *pellets* inertes não revestidos. Tal diferença pode ser atribuída à maior esfericidade dessa formulação e superfície mais lisa, em decorrência do revestimento polimérico, fazendo com que o material escoe mais facilmente no momento da determinação do ângulo de repouso.

Os resultados apresentados, no que tange a escoabilidade dos produtos, confirma que a incorporação do TESO em microesferas de tamanho reduzido leva a uma redução no fluxo do produto. Entretanto, tal problema foi contornado com sucesso por meio da incorporação dessas microesferas à superfície de *pellets* inertes, utilizando a técnica de revestimento em leito fluidizado.

4.3.8 Avaliação mecânica dos filmes de revestimento

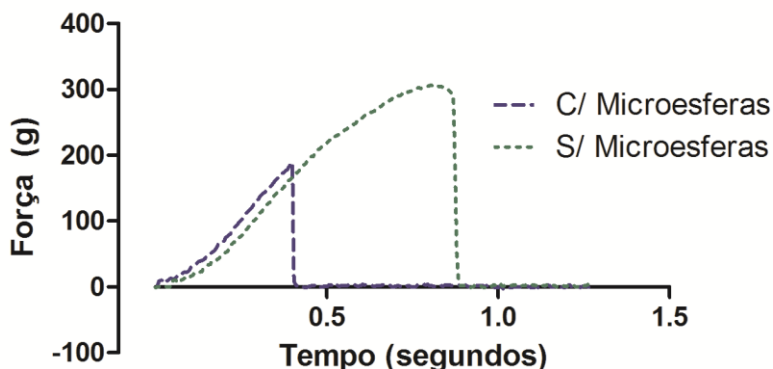
O perfil de tensão dos filmes de revestimento foi estudado para investigar o impacto da incorporação de microesferas no filme polimérico de PVA-PEG-PVA. Para tal, foi analisada a formulação de *pellets* revestidos com microesferas e uma formulação controle de *pellets* revestidos sem microesferas. A quantidade de revestimento polimérico em ambas as formulações foi a mesma, sendo a formulação que contém as microesferas composta de PVA-PEG-PVA (Kollicoat[®] Protect) na concentração de 1 % (m/m) e proporção 2:1 de suspensão de revestimento por g de pellets.

Ambos os filmes se demonstraram frágeis, com tempo de ruptura inferior a 1,0 segundo (deslocamento de 50 mm/min). A força de ruptura dos filmes foi de $304,21 \pm 1,39$ g para o filme sem microesferas e de $185,74 \pm 2,93$ g para o filme contendo microesferas (Figura 56). O filme contendo microesferas também apresentou tempo de ruptura cerca de 50 % menor quando comparado à formulação controle.

Com base nesses dados, conclui-se que a incorporação das microesferas acarreta no enfraquecimento do filme polimérico, uma vez que menor força é necessária para o seu rompimento. Essa redução na força de ruptura do filme pode ser decorrente da descontinuidade do filme polimérico, provocada pela presença de material sólido (microesferas) disperso no filme. Dessa forma, a concentração de

microesferas no filme polimérico pode ser um fator limitante, uma vez que seu aumento excessivo pode promover a perda de robustez do filme de revestimento.

Figura 56. Curvas de tensão-deformação para os filmes poliméricos de revestimento de PVA-PEG-PVA com e sem microesferas.

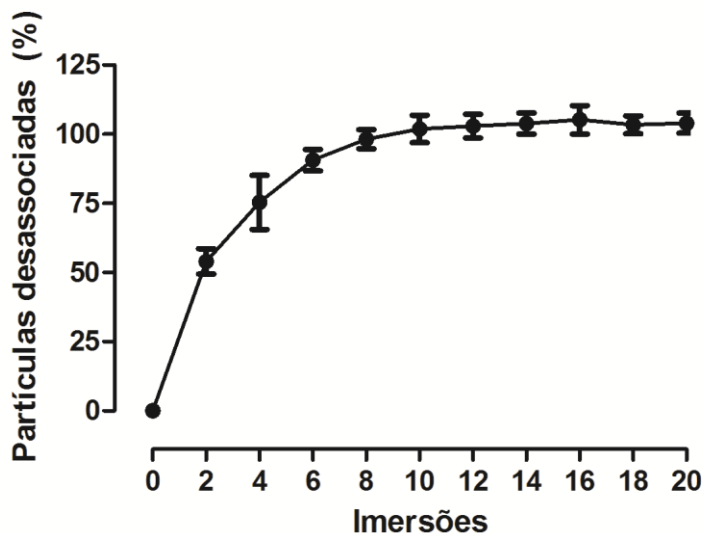


4.3.9 Avaliação da capacidade de desassociação das microesferas da superfície dos *pellets*

O ensaio de desassociação das microesferas foi realizado para determinar o quanto os *pellets* revestidos são capazes de reter as microesferas em sua superfície ao entrar em contato com meios líquidos. Os sistemas foram preparados utilizando PVA-PEG-PVA, polímero esse altamente hidrossolúvel. Portanto, espera-se que a desassociação das microesferas da estrutura dos *pellets* aconteça de forma rápida, uma vez que o intuito deste sistema é servir apenas como carreador das microesferas até o local de contato com as mucosas ou até o local da liberação do extrato vegetal.

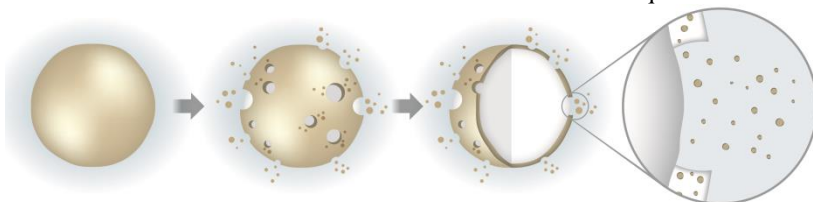
Conforme demonstrado na Figura 57, é possível notar que a desassociação das microesferas acontece rapidamente. Após cerca de 10 imersões (correspondente a 1 min e 4 seg de experimento) das câmaras contendo os sistemas no meio de dissolução, observou-se uma transferência completa das partículas para o meio. Notou-se claramente que os *pellets* retomaram a sua coloração branca após este processo, indicando visualmente a ausência de microesferas em sua superfície.

Figura 57. Curva de desassociação das microesferas da superfície dos *pellets* em tampão HCl pH 1,2.



Com base nestes resultados, constata-se que o principal objetivo neste estudo foi alcançado. A incorporação de microesferas na superfície de *pellets*, utilizando revestimento pelicular em leito fluidizado, foi capaz de promover a melhora nas propriedades mecânicas do produto, sem reter as partículas em sua superfície ao entrar em contato com o meio líquido. O comportamento observado para esses sistemas, demonstrado esquematicamente na Figura 58, foi de acordo com o esperado para o sistema, uma vez que esse atua somente como um carreador das microesferas.

Figura 58. Representação esquemática do comportamento dos *pellets* revestidos com microesferas ao entrar em contato com meio líquido.

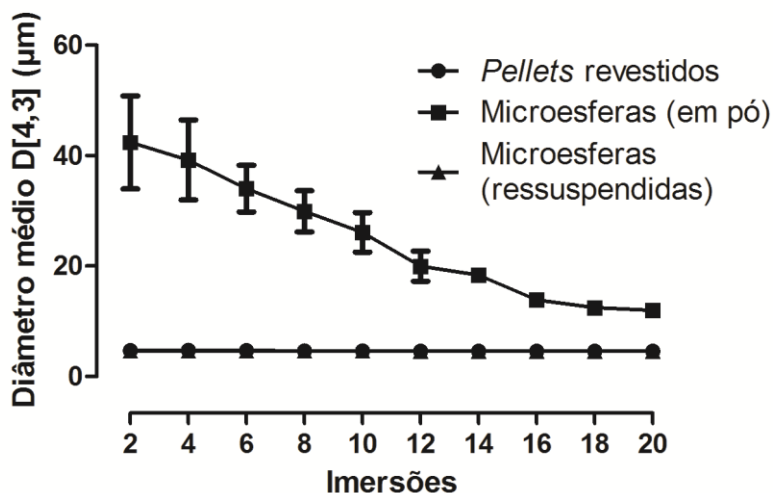


4.3.10 Avaliação da capacidade de desagregação das microesferas da superfície dos *pellets*

Após constatar que os sistemas desenvolvidos apresentam capacidade de desprender as microesferas no meio líquido rapidamente, buscou-se determinar se as microesferas são liberadas em forma de dispersão ou aglomeradas. Tal estudo foi conduzido, pois esse tipo de material apresenta alta coesão e, portanto, sua dispersão no meio líquido pode ser dificultada. A aglomeração de partículas sólidas em meio líquido pode acarretar em diversos problemas, em especial no que tange à liberação do insumo ativo do interior da partícula.

Sendo assim, nessa análise foi feita a determinação do diâmetro médio por volume equivalente ($D[4,3]$) para as alíquotas obtidas, em função do número de imersões a que o sistema foi submetido. A Figura 59 mostra o comportamento observado para o diâmetro médio.

Figura 59. Curva de desagregação das microesferas após serem liberadas da superfície dos *pellets* (pH 1,2).



Conforme demonstrado, nota-se que, ao submeter as microesferas em sua forma seca (em pó) à imersão no equipamento dissolutor, ocorre uma redução gradual no diâmetro médio de partícula. Esse fenômeno acontece porque as microesferas se encontram aglomeradas na suspensão, logo são detectadas como uma única partícula de diâmetro elevado no sistema de espalhamento de luz laser.

À medida que as imersões ocorrem, as partículas sofrem ação do movimento hidrodinâmico e se desagregam lentamente. Ao final das 20 imersões, o tamanho de partícula observado para esse grupo ainda não era equivalente ao diâmetro original das microesferas, quando ressuspendidas fazendo uso de irradiação ultrassônica como controle.

Em contrapartida, ao avaliar a formulação de *pellets* revestidos com microesferas, nota-se que as partículas presentes em suspensão se encontram com diâmetro médio idêntico à suspensão controle. Tal evento indica que, ao ocorrer a dissolução do polímero de revestimento e, conseqüentemente, a desassociação das microesferas da superfície dos *pellets*, essas são liberadas já completamente dispersas. Isso indica que as microesferas se mantêm em estado de dispersão durante todo o processo de revestimento em leito fluidizado, e assim permanecem após secagem do filme polimérico. Sendo assim, comprova-se que a incorporação de microesferas em *pellets* é duplamente benéfica, evitando também a aglomeração da suspensão das partículas em meio líquido, além melhorar os aspectos tecnológicos do produto.

4.3.11 Estudo de liberação do TESO

O ensaio de liberação do TESO a partir da estrutura das microesferas, incorporadas ou não aos *pellets*, foi investigada fazendo uso de aparato de dissolução de pás. Como controle, foi avaliada também a dissolução do extrato em pó nas mesmas condições. O tempo total de ensaio foi de 48 horas. Para ambos os casos, os perfis de dissolução observados para o extrato total, avaliado por espectroscopia na região do ultravioleta, e para o ácido clorogênico, avaliado por CLAE, foram idênticos. Entretanto, as coletas iniciais não foram quantificáveis por CLAE em decorrência da baixa concentração do marcador monitorado. Por essa razão, os resultados apresentados aqui refletem aqueles obtidos por meio da espectroscopia UV. De acordo com os cromatogramas obtidos para os pontos coletados em 48 horas, não houve degradação perceptível já que o perfil cromatográfico do extrato permaneceu idêntico.

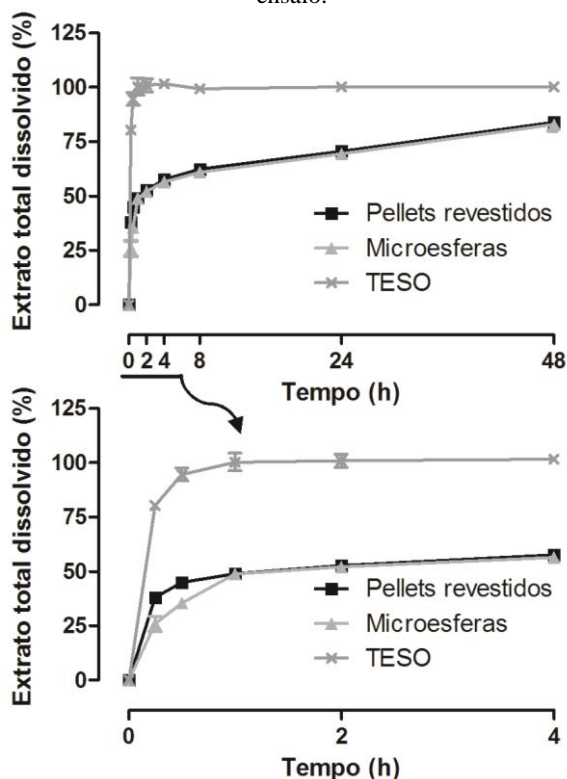
Ao avaliar o extrato em pó, percebe-se que $80,4 \pm 0,5$ % do conteúdo total são dissolvidos logo após 15 minutos (Figura 60), caracterizando uma rápida dissolução do TESO. A totalidade do extrato se encontra dissolvida no meio em apenas 1 hora ($100,3 \pm 0,6$ %). Nenhum decaimento da concentração do extrato foi observado no decorrer das 48 horas de ensaio, indicando que possíveis degradações não interferem na quantificação do mesmo neste ensaio.

Por sua vez, as microesferas se demonstraram capazes de reter a liberação quando comparado ao extrato na sua forma original. O perfil apresenta um comportamento típico para esse sistema, com uma liberação maior ocorrendo inicialmente, seguido por uma liberação sustentada por um maior período (Figura 60). Esse comportamento sugere a presença de uma grande quantidade de extrato vegetal nas porções periféricas da partícula. Esse extrato, por ser mais facilmente alcançado pelo meio de dissolução, dissolve-se mais rapidamente, propiciando o chamado efeito *burst release*. A liberação sustentada que segue o efeito *burst release* é decorrente do extrato disperso nas porções mais internas da partícula, o qual tem seu contato com o meio reduzido e, assim, difunde mais lentamente. Tal perfil aparenta ser interessante para o desenvolvimento de produtos mucoadesivos de liberação sustentada, entretanto somente ensaios *in vivo* poderão comprovar os benefícios da liberação sustentada no que tange a atividade farmacológica. Em relação ao fator de similaridade (f_2), o perfil de liberação das microesferas, em comparação ao perfil observado para o TESO em pó, apresentou um f_2 de 7, indicando que os perfis são efetivamente diferentes.

Ao avaliar o perfil de liberação das microesferas associadas aos *pellets*, nota-se um efeito *burst release* mais pronunciado seguido de um nivelamento no perfil de liberação, comparável ao perfil obtido para as microesferas. Tal comportamento, melhor visualizado no gráfico inferior da Figura 50, indica possivelmente a existência de extrato disperso no filme polimérico do revestimento dos *pellets*. Esse perfil confirma os achados nas análises de microscopia de epifluorescência, onde se verificou zonas fluorescentes no filme, com suspeita de se tratar de extrato que foi liberado das microesferas durante o processo de revestimento. Esse extrato, por secar no filme em forma de dispersão molecular, solubiliza-se concomitante à dissolução do filme polimérico, acarretando no aumento da liberação do extrato no início do ensaio. Ao avaliar esses perfis em relação ao fator de similaridade (f_2), encontra-se um fator de 48, indicando que os perfis, embora muito semelhantes, não são idênticos.

Vale ressaltar, entretanto, que a capacidade de liberação sustentada das microesferas não foi afetada pelo processo de revestimento, já que os perfis de liberação das microesferas nos *pellets* revestidos e nas microesferas livres se igualaram logo após a primeira hora do ensaio de dissolução.

Figura 60. Perfis obtidos no ensaio de liberação do TESO das microesferas, associadas ou não aos *pellets*. Gráfico inferior reflete às 4 horas iniciais do ensaio.



4.4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, explorou-se uma alternativa para a melhora das propriedades de fluxo de microesferas no estado sólido, visando assim à obtenção de produtos de adequada aplicabilidade industrial. As microesferas foram preparadas pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente, encapsulando o TESO de *C. glaziovii* previamente padronizado. A encapsulação foi alcançada com sucesso e a técnica se apresentou adequada para os fins propostos. As microesferas, após secas, apresentaram propriedades de fluxo bastante deficientes. Tais restrições foram contornadas de forma satisfatória pela incorporação dessas à superfície de *pellets* inertes, utilizando a técnica de revestimento pelicular em leito fluidizado. A mistura polimérica

comercial Kollicoat® Protect (BASF, Alemanha), constituída do copolímero de álcool polivinílico e polietileno glicol (55 – 65 %) com álcool polivinílico (35 – 45 %) (PVA-PEG-PVA), apresentou os melhores resultados no que tange à área de superfície efetivamente revestida, sendo escolhida como polímero adesivo para os estudos de incorporação das microesferas aos *pellets*. Por fim, os sistemas obtidos apresentaram excelentes propriedades mecânicas e as microesferas foram facilmente desassociadas da estrutura dos *pellets*, sem apresentar agregação. O perfil de liberação do TESO foi influenciado levemente pelo processo de revestimento pelicular, uma vez que as microesferas se mantêm em agitação durante este processo e podem liberar parte do conteúdo encapsulado.

5 CONCLUSÃO GERAL

O trabalho apresentado aqui vai ao encontro de recentes necessidades observadas no campo industrial farmacêutico, conforme nota-se pelo número crescente de pedidos de proteção intelectual nessa temática. O emprego de micro e nanoestruturas como forma de controle e veiculação de fármacos tem sido vastamente estudado no campo das ciências farmacêuticas, entretanto, poucos são os produtos contendo essas tecnologias que realmente chegam ao mercado internacional, tampouco nacional. Dessa forma, maior foco deve ser dado a estudos que busquem efetivamente transformar esses sistemas em produtos aplicáveis à indústria. Os sistemas propostos aqui visam, por meio do uso de equipamentos comumente presentes na indústria farmacêutica, a associação de sistemas submicrométricos a sistemas multiparticulados, com alta capacidade de escoamento, sem alterar significativamente sua funcionalidade. Os resultados obtidos sugerem que o sistema desenvolvido pode ser promissor na incorporação de outros tipos de micro e nanopartículas, tendo como foco a melhora das propriedades mecânicas do produto. A partir desse trabalho, algumas conclusões específicas podem ser obtidas:

- A técnica de extração por força de cisalhamento (turboextração) foi interessante para a obtenção de extratos concentrados a partir de folhas de *C. glaziovii*. O estudo da técnica foi aprofundado, fazendo uso de dois delineamentos experimentais distintos, e o processo foi desenhado em função da influência de diversos parâmetros nas características físico-químicas do extrato;
- O processo de otimização quimiométrica levou às condições extrativas ótimas a partir da função “desejabilidade”. O turboextrato seco otimizado (TESO) apresentou teor de fenólicos totais de $34,2 \pm 0,3$ % (m/m) em equivalentes de ácido gálico. O teor de ácido clorogênico foi $1,63 \pm 0,08$ % (m/m). O ácido cafeico não foi quantificável nos extratos preparados por extração por força de cisalhamento;
- O TESO apresentou ótima atividade tipo-antidepressiva, conforme demonstrado nos testes comportamentais em camundongos. A atividade foi detectada em doses bastante reduzidas, na ordem de 1 mg/kg, em intensidade similar ao controle bupropiona (10 mg/kg). Aparentemente, o extrato

apresenta efeito acumulativo após administração por 6 dias consecutivos;

- Microesferas de PLGA contendo TESO foram preparadas com sucesso pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente. A formulação apresentou diâmetro médio por volume equivalente de $4,59 \pm 0,04 \mu\text{m}$, com distribuição granulométrica monodispersa. A partícula apresentou excelentes características morfo-mecânicas para ser empregada como insumo modelo no desenvolvimento de sistemas multiparticulados visando à melhora das propriedades de fluxo;
- A associação de microesferas à superfície de *pellets* inertes foi realizada pela técnica de revestimento pelicular em leito fluidizado. O copolímero de álcool polivinílico e polietilenoglicol com álcool polivinílico (PVA-PEG-PVA), na concentração de 1 % (m/m) e proporção 2:1 de suspensão de revestimento por g de *pellets*, promoveu os melhores resultados no que tange a superfície total revestida, avaliada por análise RGB de imagem;
- Dentro das condições de revestimento determinadas, lotes com três camadas de revestimento foram preparados. O rendimento do processo de revestimento foi de $93,7 \pm 1,2 \%$. O teor de microesferas efetivamente associadas aos *pellets* foi investigado com sucesso fazendo uso de câmaras de contagem em microscopia de luz, indicando um rendimento de associação de $95,6 \pm 3,4 \%$, em concordância com o rendimento geral do processo. O teor final da formulação foi determinado como $28,07 \pm 1,01 \text{ mg}$ de microesferas por g de *pellets*;
- A estrutura formada a partir do revestimento dos *pellets* com microesferas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de epifluorescência, confirmando a presença das microesferas homogeneamente dispersas no filme polimérico. O extrato vegetal apresentou fluorescência característica em filtro vermelho. Em decorrência da fluorescência, notou-se a provável presença de extrato livre no filme de revestimento, oriundo de uma liberação prematura do extrato incorporado nas microesferas durante o processo de revestimento em leito fluidizado;
- O TESO apresentou fracas propriedades de fluxo, conforme indicado pelos índices de Carr, de Hausner e ângulo de repouso.

A incorporação do TESO às microesferas de PLGA prejudicou ainda mais as propriedades de fluxo em decorrência da redução do tamanho de partícula, alcançando valor médio de ângulo de repouso de $48,4 \pm 1,3^\circ$. A incorporação dessas nos *pellets* levou à melhora das propriedades de fluxo, tendo a formulação final um ângulo de repouso médio de $14,5 \pm 0,3^\circ$;

- As microesferas associadas aos *pellets* foram facilmente liberadas da superfície destes frente à força hidrodinâmica. Após somente 10 imersões em tampão pH 1,2, as microesferas associadas aos *pellets* já se encontravam totalmente liberadas no meio líquido. Tal característica vai ao encontro do desejado, uma vez que o sistema multiparticulado é somente um carreador das microesferas e deve as liberar rapidamente ao entrar em contato com fluidos biológicos;
- As microesferas desassociadas dos *pellets* se apresentaram completamente dispersas, diferentemente das microesferas em pó, as quais se apresentam aglomeradas no meio líquido e levam mais tempo para alcançar o diâmetro médio original;
- Os estudos de liberação do TESO a partir das microesferas indicaram que a incorporação deste na matriz polimérica de PLGA é interessante no que tange o controle da liberação. O perfil de liberação das microesferas apresentou efeito de *burst release* na primeira hora de ensaio, possivelmente devido à liberação prematura do extrato na suspensão de revestimento, seguido de liberação sustentada do restante do extrato. Em 48 h, observou-se uma liberação acumulada de cerca de 80 % do extrato total incorporado nas microesferas, demonstrando que a capacidade de sustentar a liberação não foi afetada pelo processamento.

REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, M. R.; SADEGHI, F.; AFRASIABI-GAREKANI, H. Thermal treating as a tool to produce plastic pellets based on Eudragit RS PO and RL PO aimed for tableting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 260-267, 2007.
- ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tool to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 112-120, 2013.
- AGUILAR-DE-LEYVA, A.; SHARKAWI, T.; BATAILLE, B.; BAYLAC, G.; CARABALLO, I. Release behaviour of clozapine matrix pellets based on percolation theory. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 133-141, 2011.
- ALMEIDA, M. A.; NADAL, J. M.; GRASSIOLLI, S.; PALUDO, K. S.; ZAWADZKI, S. F.; CRUZ, L.; PAULA, J. P.; FARAGO, P. V. Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, n. 1, p. 345-356, 2014.
- ANDRADE-CETTO, A.; VÁZQUEZ, R. C. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 93-97, 2010.
- ANDRADE, L. H.; WANG, Y.; ANDREONI, S.; SILVEIRA, C. M.; ALEXANDRINO-SILVA, C.; SIU, E. R.; NISHIMURA, R.; ANTHONY, J. C.; GATTAZ, W. F.; KESSLER, R. C.; VIANA, M. C. Mental Disorders in Megacities: Findings from the Sao Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. R. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 2ª ed. 775 p. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANTONY, J. **Design of Experiments for Engineers and Scientists**. 2ª ed. 220 p. Elsevier, 2014.
- ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (RE 899/03)**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.
- AREND, D. P. **Desenvolvimento de Sistema Microestruturado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba)**. 2010. 174 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

AREND, D. P.; DOS SANTOS, T. C.; SONAGLIO, D.; DOS SANTOS, A. L. G.; REGINATTO, F. H.; CAMPOS, A. M. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 58-66, 2011.

ARMSTRONG, N. A. **Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation**. 2ª ed. Londres: Taylor & Francis, 2006.

AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. D. UEM. Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke). Cl. Int. A61P 25/24; A61K 35/78. BR n. PI00066389. 28/11/2000. 2000.

AULTON, M. E.; DYER, A. M.; KHAN, K. A. The Strength and Compaction of Millispheres: The design of a controlled-release drug delivery system for ibuprofen in the form of a tablet comprising compacted polymer-coated millispheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, n. 20, p. 3069-3104, 1994.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. **Aulton's Pharmaceutics**. 4ª ed. 908 p. Churchill Livingstone, 2013.

BAERT, L.; VERMEERSCH, H.; REMON, J. P.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Study of parameters important in the spheronisation process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, p. 225-229, 1993.

BALDWIN, D. S.; MONTGOMERY, S. A.; NIL, R.; LADER, M. Discontinuation symptoms in depression and anxiety disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 10, p. 73-84, 2007.

BASHAIWOLDU, A. B.; PODCZEK, F.; NEWTON, J. M. A study on the effect of drying techniques on the mechanical properties of pellets and compacted pellets. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 2-3, p. 119-129, 2004.

BECHGAARD, H. Critical factor influencing gastrointestinal absorption: What is the role of pellets? **Acta Pharmaceutica Technologica**, v. 28, p. 149-157, 1982.

BENBETTAÏEB, N.; KARBOWIAK, T.; BORNAZ, S.; DEBEAUFORT, F. Spectroscopic analyses of the influence of electron beam irradiation doses on mechanical, transport properties and microstructure of chitosan-fish gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 37-51, 2015.

BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. **Cecropia, Flora Neotropica**. Nova Iorque: The New York Botanical Garden, 2005.

BERINGHS, A. O.; SOUZA, F. M.; DE CAMPOS, A. M.; FERRAZ, H. G.; SONAGLIO, D. Technological development of *Cecropia glaziovii* Snetl. extract pellets by extrusion-spheronization. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 161-168, 2013.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; DICKO, A.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. **The Journal of Neuroscience**, v. 262, n. 1-2, p. 77-84, 2007.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum condition. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B**, v. 13, n. 1, p. 1-45, 1951.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: 2010.

BUILDERS, P. F.; KUNLE, O. O.; OKPAKU, L. C.; BUILDERS, M. I.; ATTAMA, A. A.; ADIKWU, M. U. Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 777-783, 2008.

BUTLER, N. A. Classification of efficient two-level fractional factorial designs of resolution IV or more. **Journal of Statistical Planning and Inference**, v. 131, n. 1, p. 145-159, 2005.

CARR, R. L. Evaluating flow properties of solids. **Chemical Engineering**, v. 72, p. 163-168, 1965.

CASTAGNÉ, V.; PORSOLT, R. D.; MOSER, P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, p. 128-133, 2009.

CHATCHAWALSAISIN, J.; PODCZECK, F.; NEWTON, J. M. The preparation by extrusion/spheronization and the properties of pellets containing drugs, microcrystalline cellulose and glyceryl monostearate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 24, p. 35-48, 2005.

CHO, A.-S.; JEON, S.-M.; KIM, M.-J.; YEO, J.; SEO, K.-I.; CHOI, M.-S.; LEE, M.-K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937-943, 2010.

CHOPRA, R.; ALDERBORN, G.; NEWTON, J. M.; PODCZECK, F. The influence of film coating on the pellet properties. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7, p. 59-68, 2002.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

COSTA, P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, n. 1-2, p. 77-83, 2001.

CROWDER, T. M.; HICKEY, A. J. The physics of powder flow applied to pharmaceutical solids. **Pharmaceutical Technology**, v. 24, p. 50-58, 2000.

DE SOUZA, A. P. T. B.; BARNI, S. T.; FERREIRA, R. A.; COUTO, A. G. Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis* L. Empregando Planejamento Fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 13-21, 2010.

DE SOUZA, M. C.; MARCHETTI, J. M. Development of albendazole sulfoxide-loaded Eudragit microparticles: A potential strategy to improve the drug bioavailability. **Advanced Powder Technology**, v. 23, n. 6, p. 801-807, 2012.

DEL ÁGUILLA, M. J. S.; SCHENK, M.; KERN, K.-U.; DROST, T.; STEIGERWALD, I. Practical Considerations for the Use of Tapentadol Prolonged Release for the Management of Severe Chronic Pain. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 94-113, 2015.

DELARCINA JR., S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; LAPA, A. J. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea-pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth. extracts and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 328-332, 2007.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DHANDA, D. S.; TYAGI, P.; MIRVISH, S. S.; KOMPELLA, U. B. Supercritical fluid technology based large porous celecoxib-PLGA microparticles do not induce pulmonary fibrosis and sustain drug delivery and efficacy for several weeks following a single dose. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 3, p. 239-250, 2013.

DOS SANTOS, T. C. **Microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* para o tratamento da hipertensão arterial**. 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how? **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 44, p. 15-23, 1997.

EMERY, E.; OLIVER, J.; PUGSLEY, T.; SHARMA, J.; ZHOU, J. Flowability of moist pharmaceutical powders. **Powder Technology**, v. 189, p. 409-415, 2009.

ETTINGER, A. B.; BAKER, G. A. Best clinical and research practice in epilepsy of older people: Focus on antiepileptic drug adherence. **Epilepsy & Behavior**, v. 15, n. 2, p. S60-63, 2009.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.; DONANGELO, C. M.; LAFAY, S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 2309-2315, 2008.

FOCA, G.; MASINO, F.; ANTONELLI, A.; ULRICI, A. Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 2, p. 238-245, 2011.

FRANCO-ROSSELLI; BERG, C. C. Distributional patterns of *Cecropia* (Cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. **Caldasia**, v. 19, n. 1-2, p. 285-296, 1997.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.

GAIGNAUX, A.; RÉEFF, J.; SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; DE VRIESE, C.; GOOLE, J.; AMIGHI, K. Development and evaluation of a sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1-2, p. 20-28, 2012.

GANDHI, R.; ASHOKRAJ, Y.; KAUL, C. L.; PANCHAGNULA, R. Using extrusion-spheronization to develop controlled release formulations of azithromycin. **Pharmaceutical Technology**, v. 29, n. 2, p. 68-86, 2005.

GAREKANI, H. A.; MOGHADDAM, Z. F.; SADEGHI, F. Organic solution versus aqueous dispersion of Eudragit RS in preparation of sustained release microparticles of theophylline using spray drying. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 374-379, 2013.

GHEBRE-SELLASSIE, I. **Pharmaceutical Pelletization Technology**. 274 p. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1989.

_____. **Multiparticulate oral drug delivery**. 480 p. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1994.

GIRI, T. K.; CHOUDHARY, C.; AJAZUDDIN, A. A.; BADWAIK, H.; TRIPATHI, D. K. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 125-141, 2013.

GÓMEZ-CARRACEDO, A.; SOUTO, C.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; CONCEIRO, A.; GÓMEZ-AMOZA, J. L. Incidence of drying on microstructure and drug release profiles from tablets of MCC–lactose–Carbopol® and MCC–dicalcium phosphate–Carbopol® pellets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 675-685, 2008.

GOTO, T.; MORISHITA, M.; KAVIMANDAN, N. J.; TAKAYAMA, K.; PEPPAS, N. A. Gastrointestinal Transit and Mucoadhesive Characteristics of Complexation Hydrogels in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 2, p. 462-469, 2006.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HANSULD, E. M.; BRIENS, L. A review of monitoring methods for pharmaceutical wet granulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 192-201, 2014.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. **International Journal of Powder Metallurgy**, v. 3, p. 7-13, 1967.

HEALY, A. M.; AMARO, M. I.; PALUCH, K. J.; TAJBER, L. Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 75, p. 32-52, 2014.

HEDE, P. D.; BACH, P.; JENSEN, A. D. Small-scale top-spray fluidised bed coating: Granule impact strength, agglomeration tendency and coating layer morphology. **Powder Technology**, v. 176, n. 2-3, p. 156-167, 2007.

_____. Top-spray fluid bed coating: Scale-up in terms of relative droplet size and drying force. **Powder Technology**, v. 184, n. 3, p. 318-332, 2008.

HEMMERLE, H.; BURGER, H. J.; BELOW, P.; SCHUBERT, G.; RIPPEL, R.; SCHINDLER, P. W.; PAULUS, E.; HERLING, A. W. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 137-145, 1997.

HICKEY, A. J.; CROWDER, T. M.; LOUEY, M. D.; ORR, N. **A Guide to Pharmaceutical Particulate Science**. 256 p. Londres: Taylor & Francis, 2003.

HOLTZHEIMER, P. E.; NEMEROFF, C. B. Advances in the treatment of depression. **NeuroRx - The Journal of The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 3, p. 42-56, 2006.

HOSSEINI, S. G.; ESLAMI, A. Orthogonal array design method for optimization experiments of sodium azide microencapsulation with stearic acid. **Progress in Organic Coatings**, v. 68, n. 4, p. 313-318, 2010.

HUA, F. J.; PARK, T. G.; LEE, D. S. A facile preparation of highly interconnected macroporous poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) scaffolds by liquid-liquid phase separation of a PLGA-dioxane-water ternary system. **Polymer**, v. 44, p. 1911-1920, 2003.

HUANG, D.-W.; SHEN, S.-C. Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism via modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 358-366, 2012.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2(R1)**. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005.

IQBAL, S.; BALOCH, M. K.; HAMEED, G.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1613-1620, 2013.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

JIANG, T.; SINGH, B.; LI, H.; KIM, Y.; KANG, S.; NAH, J.; CHOI, Y.; CHO, C. Targeted oral delivery of BmpB vaccine using porous PLGA microparticles coated with M cell homing peptide-coupled chitosan. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2365-2373, 2014.

JOHANSSON, B.; ALDERBORN, G. Degree of pellet deformation during compaction and its relationship to the tensile strength of tablets formed of microcrystalline cellulose pellets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 132, n. 1-2, p. 207-220, 1996.

JONES, B.; GOOS, P. I-optimal versus D-optimal split-plot response surface designs. **Journal of Quality Technology**, v. 44, p. 85-101, 2012.

JONES, B. E. The filling of powders into two-piece hard capsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 227, n. 1-2, p. 5-26, 2001.

KÁLLAI, N.; LUHN, O.; DREDÁN, J.; KOVÁCS, K.; LENGYEL, M.; ANTAL, I. Evaluation of Drug Release from Coated Pellets Based on Isomalt, Sugar and Microcrystalline Cellulose Inert Cores. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 383-391, 2010.

KAVIANY, M. **Heat Transfer Physics**. 688 p. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

KECK, C. M.; MULLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 150-163, 2008.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.

KLEINEBUDDE, P. The crystallite-gel-model for microcrystalline cellulose in wet-granulation extrusion and spheronization. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 6, p. 804-809, 1997.

KOESTER, M.; THOMMES, M. New insights into the Pelletization Mechanism by Extrusion/Spheronization. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1549-1551, 2010.

_____. Quantification of Mass Transfer During Spheronisation. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 2, p. 493-497, 2012.

KOESTER, M.; WILLEMSSEN, E.; KRUEGER, C.; THOMMES, M. Systematic evaluations regarding interparticular mass transfer in spheronization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, p. 84-89, 2012.

KUMAR, A.; LAHIRI, S. S.; SINGH, H. Development of PEGDMA: MAA based hydrogel microparticles for oral insulin delivery. **International journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 117-124, 2006.

LAFAY, S.; MORAND, C.; MANACH, C.; BENSSON, C.; SCALBERT, A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 1, p. 39-46, 2006.

LEPELLEY, M.; CHEMINADE, G.; TREMILLON, N.; SIMKIN, A.; CAILLET, V.; MCCARTHY, J. Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. **Plant Science**, v. 172, n. 5, p. 978-996, 2007.

LERNER, E. I.; ROSENBERGER, V.; FLASHNER-BARAK, M.; DRABKIN, A.; MOLDAVSKI, N. **TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD**. Drug microparticles, processes of preparing them and a drug delivery vehicle comprising them. US8663703 B2. 2014.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C. L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. **Chinese Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1-16, 2008.

LIEW, C. V.; CHUA, S. M.; HENG, P. W. S. Elucidation of spheroid formation with and without the extrusion step. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 1, p. 70-81, 2007.

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R. M.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 315-320, 2007.

LINGAM, R.; SCOTT, J. Treatment non-adherence in affective disorders. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 105, n. 3, p. 164-172, 2002.

LIZIO, R.; PETEREIT, H.-U.; TRUPTI, D.; GOTTSCHALK, M. **EVONIK RÖHM GMBH**. Multiparticulate form of administration, comprising nucleic acid-containing mucoadhesive active ingredients, and method for producing said form of administration. US8568778B2. 2013.

LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; FERRIT, M.; LUQUE, R. Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. **Talanta**, v. 60, n. 2-3, p. 609-616, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, 2008.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MAO, D.; YANIV, Z. **APPLIED NANOTECH HOLDINGS, I**. Composites. WO2010104710A1. 2010.

MARLEBI, F. K.; SAVOIA, M. G.; BERNICK, M. A. Aderência ao tratamento em fóbicos sociais: um estudo qualitativo. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 2, n. 2, p. 147-155, 2000.

MAZZARINO, L.; TRAVELET, C.; ORTEGA-MURILLO, S.; OTSUKA, I.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58-66, 2012.

MCGINITY, J. W.; FELTON, L. A. **Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms**. 3ª ed. 512 p. Londres: Informa Healthcare, 2008.

MEHTA, S.; DE BEER, T.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Effect of disintegrants on the properties of multiparticulate tablets comprising starch pellets and excipient granules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 310-317, 2012.

MERKKU, P.; LINDQVIST, A.-S.; LEIVISKA, K.; YLIRUUSI, J. Influence of granulation and compression process variables on flow rate of granules and on tablet properties, with special reference to weight variation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 102, n. 1-3, p. 117-125, 1994.

MIZOE, T.; OZEKI, T.; OKADA, H. Preparation of drug nanoparticle-containing microparticles using a 4-fluid nozzle spray drier for oral, pulmonary, and injection dosage forms. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 1, p. 10-15, 2007.

MOUSSAVI, S.; CHATTERJI, S.; VERDES, E. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. **Lancet**, v. 370, p. 851-858, 2007.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 1997.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3ª ed. 680 p. Wiley & Sons Inc., 2009.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 2002.

NUWAYSER, E. S.; NUCEFORA, W. A. **BIOTEK**. Composite core coated microparticles and process of preparing same. US4568559A. 1986.

OLIVEIRA, A. **A terapia combinada de exercício físico e creatina induz efeito tipo-antidepressivo e aumento de BDNF no hipocampo de camundongos**. 2014. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OSÓRIO, J.; OSÓRIO, M. L.; CORREIA, P. J.; DE VARENNES, A.; PESTANA, M. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 148-155, 2014.

PAPAKOSTAS, G. Tolerability of modern antidepressants. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, p. 8-13, 2008.

PATHAN, S. A.; IGBAL, Z.; SAHANI, J. K.; TALENGAONKAR, S.; KHAR, R. K.; AHMAD, F. J. Buccoadhesive drug delivery systems - extensive review on

recent patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 2, n. 2, p. 177-188, 2008.

PERGE, L.; ROBITZER, M.; GUILLEMOT, C.; DEVOISSELLE, J.; QUIGNARD, F.; LEGRAND, P. New solid lipid microparticles for controlled ibuprofen release: Formulation and characterization study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 59-67, 2012.

PETRONILHO, H.; DAL-PIZZOL, F.; COSTA, G. M.; KAPPEL, V. D.; DE OLIVEIRA, S. Q.; FORTUNATO, J.; CITTADINI-ZANETTE, V.; MOREIRA, J. C.; DAL-PIZZOL, F.; REGINATTO, F. H. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embaúba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911-918, 2012.

PIMENTEL, L. F.; JÚNIOR, A. T. J.; MOSQUEIRA, C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PODCZECK, F.; RAHMAN, S. R.; NEWTON, J. M. Evaluation of a standardised procedure to assess the shape of pellets using image analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, n. 2, p. 123-138, 1999.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977.

QUINTANAR, G. D.; GANEM, R. F. A.; CAMACHO, O. E. A.; JIMENEZ, C. P. E.; LOPEZ, P. M. R.; GUERRERO, D. Q.; RONDERO, F. A. G.; ORTIZ, E. A. C.; CARLOS, P. E. J.; PADILLA, M. R. L. **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO, U. N. A. M.** Pharmaceutical coating based on a mixture of solid lipidic nanoparticles and polymers. MX2010005803A. 2011.

ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth. in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 183-190, 2002.

ROCHA, F. F.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M. M.; LIMA, T. C. M.; LAPA, A. J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth. and its constituents - *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 396-402, 2007.

ROWE, R. C. Spheronization: a novel pill-making process? **Journal Pharmaceutical International**, v. 6, p. 119-123, 1985.

RUNCAN, P. L.; HATEGAN, M.; BARBAT, C.; ALEXIU, M. T. The emergence of depression in the elderly. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 2, n. 2, p. 4966-4971, 2010.

SAMBO, F.; BORROTTI, M.; MYLONA, K. A coordinate-exchange two-phase local search algorithm for the D- and I-optimal designs of split-plot experiments. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 71, p. 1193-1207, 2014.

SÁNCHEZ, M. S.; SARABIA, L. A.; ORTIZ, M. C. On the construction of experimental designs for a given task by jointly optimizing several quality criteria: Pareto-optimal experimental designs. **Analytica Chimica Acta**, v. 754, p. 39-46, 2012.

SANTOS, H.; VEIGA, F.; PINA, M. E.; SOUSA, J. J. Compaction, compression and drug release characteristics of xanthan gum pellets of different compositions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 2-3, p. 271-281, 2004.

SCHOFIELD, D. J.; CALLANDER, E. J.; SHRESTHA, R. N.; PASSEY, M. E.; PERCIVAL, R.; KELLY, S. J. The indirect economic impacts of co-morbidities on people with depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 6, p. 796-801, 2013.

SCHWEITZER, I.; MAGUIRE, K.; NG, C. Sexual side-effects of contemporary antidepressants: review. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 43, p. 795-808, 2009.

SHAM, J. O.; ZHANG, Y.; FINLAY, W. H.; ROA, W. H.; LOBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 2, p. 457-467, 2004.

SHINBACH, M. P.; BARAN, J. R. **3M INNOVATIVE PROPERTIES, C.** Having improved dispersibility, floodability, flowability, fluidization, packing factor, and/or tap density and/or decrease bulk volume and/or entrained gas of the plurality of particles relative to the plurality of particles free of nanoparticles. US20080152913A1. 2008.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143-148, 2010.

SINGH, K.; TIWARY, A. K.; RANA, V. Spray dried chitosan-EDTA superior microparticles as solid substrate for oral delivery of amphotericin B. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 310-319, 2013.

SONAGLIO, D. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010. p.221-258.

SOOD, A.; ASHOKRAJ, Y.; PANCHAGULA, R. Controlled-release dosage forms for diltiazem hydrochloride. **Pharmaceutical Technology**, v. 28, n. 4, p. 62-85, 2004.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth. and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 462-469, 2008.

SUKSAMRAN, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T.; SAJOMSANG, W.; PITAKSUTEEPONG, T.; OPANASOPIT, P. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminocinnamyl) chitosan-coated electrospray OVA-loaded microparticles for oral vaccination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 19-27, 2013.

SUTARIYA, V.; GROSHEV, A.; SADANA, P.; BHATIA, D.; PATHAK, Y. Artificial Neural Networks in Drug Delivery and Pharmaceutical Research. **The Open Bioinformatics Journal**, v. 7, p. 49-62, 2013.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; INAZU, M.; EGASHIRA, T.; MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 261-267, 2002.

TALUJA, A.; YOUN, Y. S.; BAE, Y. H. Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 4002-4014, 2007.

TAWFEEK, H. M.; EVANS, A. R.; IFTIKHAR, A.; MOHAMMED, A. R.; SHABIR, A.; SOMAVARAPU, S.; HUTCHEON, G. A.; SALEEM, I. Y. Dry powder inhalation of macromolecules using novel PEG-co-polyester microparticle carriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 441, n. 1-2, p. 611-619, 2013.

TEUNOU, E.; PONCELET, D. Batch and continuous fluid bed coating – review and state of the art. **Journal of Food Engineering**, v. 53, n. 4, p. 325-340, 2002.

TINKE, A. P.; CARNICER, A.; GOVOREANU, R.; SCHELTJENS, G.; LAUWERYSEN, L.; MERTENS, N.; VANHOUTTE, K.; BREWSTER, M. E. Particle shape and orientation in laser diffraction and static image analysis size distribution analysis of micrometer sized rectangular particles. **Powder Technology**, v. 186, n. 2, p. 154-167, 2008.

TOKÁROVÁ, V.; KASPAR, O.; KNEJZLÍK, Z.; ULBRICH, P.; STEPÁNEK, F. Development of spray-dried chitosan microcarriers for nanoparticle delivery. **Powder Technology**, v. 235, p. 797-805, 2013.

VALENTE, G.; RINALDI, L.; SGAMBATO, M.; PIAI, G. Conversion From Twice-Daily to Once-Daily Tacrolimus in Stable Liver Transplant Patients: Effectiveness in a Real-World Setting. **Transplantation Proceedings**, v. 45, n. 3, p. 1273-1275, 2013.

VAN BERKUM, E. E. M.; HABERS, E. J.; VEN, P. M. V. D.; WIJNEN, J. T. M. Fractional factorial designs for two-step production process. **Journal of Statistical Planning and Inference**, v. 132, n. 1-2, p. 53-62, 2005.

VISSER, J. Van der Waals and other cohesive forces affecting powder fluidization. **Powder Technology**, v. 58, p. 1-10, 1989.

WAN, F.; WU, J. X.; BOHR, A.; BALDURSDOTTIR, S. G.; MALTESEN, M. J.; BJERREGAARD, S.; FOGED, C.; RANTANEN, J.; YANG, M. Impact of PLGA molecular behavior in the feed solution on the drug release kinetics of spray dried microparticles. **Polymer**, v. 54, n. 21, p. 5920–5927, 2013.

YE, M.; KIM, S.; PARK, K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 241-260, 2010.